Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Untersuchungen über die ^{57}Co-Vitamin-B_{12}-Bindungskapazität des menschlichen Seminalplasmas

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Kroehling
aus Posen

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0048

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Untersuchungen über die ^{57}Co-Vitamin-B_{12}-Bindungskapazität des menschlichen Seminalplasmas

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Kroehling
aus Posen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
(Professor Dr.Dr. h.c. H.E. Bock)
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Adam

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG · Tübingen

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Allgemeines	3
	1.) Ejakulat	3
	2.) Vitamin B_{12}	4
III.	Methoden	9
	1.) A.S.-Fällungsmethode, Schema I	9
	2.) A.S.-Fällungsmethode, Schema II	11
	3.) Dialysiermethode	12
	4.) Säulenchromatographie	14
	5.) Immunelektrophoresen	16
	6.) Radioaktivitätsmessungen	17
IV.	Ergebnisse	17
	1.) Bindungswerte bei A.S.-Fällung	17
	2.) Bindungswerte bei Dialyse	36
	3.) Versuche mit DEAE-Sephadex-Gel A 50	78
	4.) Immunelektrophoresen	83
	5.) Autoradiographien	88
V.	Diskussion	89
VI.	Zusammenfassung	94
VII.	Anhang: Abb. 1 - 15	97
	Literaturverzeichnis	114

I. Einleitung

Nach Meinung verschiedener Autoren soll die Ursache bei ungewollt kinderlos gebliebenen Ehen bis zu 50 % beim Mann liegen (MONCORPS 1949, KEETTEL et.al. 1956, NIKOLOWSKI 1962). Da die Proteinzusammensetzung des Seminalplasmas oder sonstige physiologisch-chemische Eigenschaften des Ejakulates die Befruchtungsfähigkeit beeinflussen könnten, wurde versucht, Beziehungen zwischen abnormen Ejakulatswerten und Infertilität herzustellen. MAC LEOD (1951) prüfte die Abhängigkeit der Fertilität von der Menge des Ejakulates, DOEPFMER (1958) von der Zahl der Spermien, HEINKE (1951) von der Vitalität der Spermien bei Eosinfärbung, JOEL u. EICHENBERGER (1950) von der Hyaluronidaseaktivität, WALTON u. EDWARDS (1950) vom Sauerstoffverbrauch, SØRENSEN (1942) und BÖNNER (1960) von der Dehydrierungskraft der Spermien, COMSTOCK (1939) von der Glykolysefähigkeit, EICHENBERGER u. GOOSSEN (1950) vom Fructosegehalt des Ejakulates und TSCHUMI (1953), SILLO-SEIDEL (1963) sowie STIGLER (1960) von der linearen Beweglichkeit der Spermien. Jedoch konnten sich nur wenige der angegebenen Methoden für eine Beurteilung der Qualität des Samens bewähren. VRUBLOWSKY et.al. fanden, daß der Anteil an gebundenen Hexosen im Humanspermaplasma etwa zwei- bis dreimal höher ist als im Blut.

Nach SIMONS sollen alle bisher bekannten Vitamin B_{12} bindenden Proteine Glykoproteine sein. Da das Vitamin B_{12} für die Synthese von Nukleinsäuren wesentliche Bedeutung hat (BOCK et.al. 1967, FLEISCHHACKER 1961), lag die Vermutung nahe, daß sich ein Vitamin B_{12}-Mangel auch auf die Spermiogenese in negativer Weise auswirken müßte. Über die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit des menschlichen Seminalplasmas war bisher wenig bekannt. Lediglich KARYPIDIS berichtete über hohe Vitamin B_{12}-Bindungswerte im menschlichen Seminalplasma.

Der vorliegenden Arbeit lagen folgende Fragen zugrunde:

1. Wie hoch ist die Vitamin B_{12}-Bindungskapazität im menschlichen Ejakulat?

2. Unterscheiden sich die Bindungswerte pathologisch veränderter Ejakulate von denen normaler Ejakulate?

II. Allgemeines

1.) Ejakulat

Über die geschichtliche Entwicklung der Spermatologie und ihre Untersuchungsmethoden berichtet JOEL (1953) in seinem Buch "Studien am menschlichen Sperma" ausführlich. In neuerer Zeit haben verschiedene Autoren menschliche Ejakulatproben mit Hilfe der Papierelektrophorese untersucht (KELLER u. TSCHUMI, 1953; NOCKE, 1959; OBE u. HERRMANN, 1954 und SCHNEIDER et.al., 1954). Eine Beziehung zwischen der Zusammensetzung der Spermaplasmaproteine und der Fertilität konnte jedoch nicht gefunden werden. Sowohl die Anzahl als auch die relative Konzentration der einzelnen Proteinfraktionen des Spermaplasmas waren inkonstant und schwankten individuell (NOCKE, 1959). Bei wiederholten Untersuchungen von Ejakulaten desselben Patienten schwankten Anzahl und Konzentration der Proteinfraktionen ebenfalls (NOCKE, 1959).

Bei immunelektrophoretischen Untersuchungen von menschlichem Seminalplasma wurden von verschiedenen Autoren je nach Versuchsbedingungen zwischen sieben und elf substratspezifische Präzipitationssicheln gefunden (BANDHAUER et.al., 1964; HERRMANN, 1966; LEITHOFF u. LEITHOFF, 1961; LICHT u. KEUTEL, 1963; und SEARCY u. CRAIG, 1961), wovon sechs Fraktionen aus der Prostata (MATTILA, 1967), vier aus den Spermatozoen und eine aus der Epididymis (BANDHAUER et.al., 1964) stammen sollen. Mit dem Coombs-Test konnte die Anwesenheit von Gamma-Globulin im Seminalplasma nachgewiesen werden. Bei entzündlichen Prozessen im Bereich der Samenwege und der Adnexe können alle Blutserumproteinfraktionen im Seminalplasma nachgewiesen werden (LEIT-HOFF u. LEITHOFF, 1961).

Übereinstimmend wird von mehreren Autoren auf die Bedeutung des Zeitfaktors bei der Beurteilung von Ejakulatproben hingewiesen (ADAM u. KORTING, 1955; NOCKE, 1959; VRUBLOVSKY et.al., 1966). Schon bald nach der Ejakulation werden die Spermaplasmaprotein durch Proteasen gespalten, so daß freie Aminosäuren und Proteosen zunehmen, während die nicht-dialysierbaren Proteine abnehmen (NOCKE, 1959). Auch hinsichtlich des Verteilungsmusters der freien Aminosäuren konnten keine Gesetzmäßigkeiten bei pathologisch veränderten Ejakulaten gefunden werden (ADAM, 1955).

Über die Biochemie des menschlichen Samens wurden von verschiedenen Autoren umfassende Angaben gemacht (BREHM et.al. 1956; EICHENBERGER u. GOOSSENS, 1950; HUGGINS et.al., 1942; KIMMIG, 1955; LUNDQUIST, 1952; MANN, 1954; MICHELSON u. KOETS, 1956; RABACH u. HRADEC, 1954 und VASTERLING, 1960). Die Bedeutung einiger Spermaplasmabestandteile scheint bekannt zu sein (Fructose, Hyaluronidase, Phosphatase, Proteinasen, hoher Proteosen- und Aminosäurengehalt), über die Funktion einiger anderer auffälliger Seminalplasmabestandteile können bisher nur Vermutungen geäußert werden (hoher Gehalt an Vitamin C, Zitronensäure, Inosit und Glykoproteinen) (KIMMIG u. SCHIRREN, 1956; NOVAKOVSKI u. SCHMIDT, 1959 und TSCHUMI, 1953). Der Anteil an gebundenen Hexosen (besonders Galactose, Mannose; keine Fructose) im Humanspermaplasma soll etwa zwei- bis dreimal höher sein als im Blut (VRUBLOVSKY, 1966).

2.) Vitamin B_{12}

Das Vitamin B_{12} wurde 1948 von RICKES et.al. und von SMITH isoliert. Aus vier Tonnen Leber ließ sich ein Milligramm Vitamin B_{12} gewinnen (RICKES et.al., 1948). 1949 führte REISNER die parenterale Therapie der perniziösen Anämie mit

kristallinem Vitamin B_{12} ein (SCHMID et.al., 1964). 1953 gelang es TODD u. JOHNSON, die Strukturformel des Vitamin B_{12} aufzuklären (ARMITAGE et.al., 1953). Sie ähnelt den natürlichen Porphyrinskeletten des Häms, des Cytochroms C und des Chlorophylls (BEGEMANN u. RASTETTER, 1962). Ein zentrales dreiwertiges Co-Atom ist an vier partiell hydrierte Pyrrolringe gebunden, die über Methinbrücken zu einem Makroring verknüpft sind (BECK, 1962; SMITH, 1956). In den folgenden Jahren fand man eine Methode, das Vitamin B_{12} als Nebenprodukt bei der Herstellung bestimmter Antibiotika zu gewinnen (BEGEMANN u. RASTETTER, 1962; BRUCK, 1955).

Das Vitamin B_{12} kommt in allen animalischen Geweben vor (BRUCK, 1955), besonders in Leber, Milz, Niere, Pankreas, Thymus, Muskelfleisch und Eiern (STÜBER, 1966). Karnivoren und der Mensch nehmen das Vitamin B_{12} mit der Fleischnahrung auf (BEGEMANN u. RASTETTER, 1962; PRIBILLA, 1962). Der absolute Tagesbedarf des Menschen liegt bei drei bis fünf Mikrogramm (BERLIN et.al., 1961; GABBE, 1963; PRIBILLA, 1962). Der gesamte Vitamin B_{12}-Gehalt des menschlichen Körpers beträgt ca. vier bis fünf Milligramm. Das Vitamin B_{12} wird hauptsächlich als Hydroxocobalamin in der Leber (BARBEE u. JOHNSON, 1951), der Milz, der Niere (DOSCHERHOLMEN et.al., 1960) und im Magen-Darm-Trakt gespeichert (SIMONS, 1964). Aufgefüllte Vitamin B_{12}-Depots sind im allgemeinen erst nach zwei bis sechs Jahren erschöpft (FRICK u. BRUNNER, 1964).

Über den Resorptionsmechanismus des Vitamins B_{12} besteht noch keine lückenlose Klarheit (HEATHCOTE u. MOONEY, 1958). Am häufigsten diskutiert ist die Extrinsic-Intrinsic-Factor-Theorie: Das Vitamin B_{12} (= extrinsic-factor) wird mit der Nahrung aufgenommen. Im Fundus und

Corpus ventriculi wird der Intrinsic-factor (= I.F.) gebildet. Extrinsic-factor und Intrinsic-factor verbinden sich und werden von der Ileumschleimhaut resorbiert (ALLCOCK, 1961; PRIBILLA 1962; SAUER, 1958). Die Voraussetzungen für eine Vitamin B_{12}-Resorption sind:

1. Eine intakte Ileumschleimhaut
2. Vorhandensein von Ca^{++}
3. Ein bestimmter pH-Wert (maximale Wirksamkeit bei pH 5,9)
4. Ein Releasingfactor, der das Vitamin B_{12} wieder aus der Komplexbindung mit dem I.F. löst. (STÜBER, 1966).

Bei der Übertragung des im Blut zirkulierenden Vitamins B_{12} auf die Vitamin B_{12}-Depots spielt wahrscheinlich eine B_{12}-Transferase eine Rolle (FLEISCHHACKER, 1961).

Im Blutserum kommen zwei Vitamin B_{12}-bindende Komponenten vor, die von HALL und FINKLER als Transcobalamin I (= TC I) und Transcobalamin II (= TC II) bezeichnet wurden (HALL u. FINKLER, 1963; HALL u. FINKLER, 1965). Endogenes Vitamin B_{12} ist an ein $Alpha_1$-Globulin (= TC I) gebunden (HOM et.al., 1966; LAWRENCE, 1966), während oral oder parenteral zugefügtes Vitamin B_{12} zuerst an ein Beta-Globulin (= TC II) gebunden wird. Da aber die Umsatzrate von an TC II gebundenem Vitamin B_{12} relativ hoch ist (Halbwertszeit von wenigen Stunden), wird schon nach einigen Stunden der Hauptanteil des gegebenen Vitamins B_{12} an $Alpha_1$-Globulin gebunden gefunden (HOM et.al., 1966). In vitro zugesetztes Vitamin B_{12} wird von einem Beta-Globulin gebunden (HOM et.al., 1966; LAWRENCE, 1966). Der normale Vitamin B_{12}-Spiegel im Blut liegt bei 150 - 900 pg/ml. Das Vitamin B_{12}-Bindungsvermögen des Blutes beträgt jedoch

600 - 2425 pg/ml (FLEISCHHACKER, 1963). Im Blut liegt das Vitamin B_{12} als Hydroxocobalamin (90 %), Cyanocobalamin (10 %) und in Spuren als Dimethylbenzimidazol-Coenzym und in einer bisher noch nicht näher beschriebenen Form vor (LINDSTRAND u. STAHLBERG, 1963; SUREAU et.al., 1962). Unter Lichteinfluß geht die Cyanoform sehr leicht in die Hydroxoform über. Ein Zusatz von $CoCl_2$-Lösung soll dies verhindern (SIMONS, 1964). Fast alle bisher bekannten Vitamin B_{12}-bindenden Substanzen scheinen Glykoproteine zu sein (KALLEE et.al., 1964; SCHULTZE, 1958; SIMONS, 1964). Die Vitamin B_{12}-bindenden Substanzen konnte man bisher nur autoradiographisch, nicht jedoch in Immunelektrophoresen als native Präzipitationssicheln nachweisen (KARYPIDIS, 1966; SIMONS, 1964).

Die Hauptfunktion des Vitamins B_{12} ist die eines katalytischen Prinzips (PANZRAM, 1961). Das Vitamin B_{12} ist eingeschaltet in den Fermentprozeß von Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel (BECK, 1962; DISHKOVICH, 1958; GOUNELLE u. MARNAY, 1960; PANZRAM, 1961 und SUREAU et.al., 1962). Die Synthese labiler Methylgruppen und die Bildung von Methionin aus Homocystein ist eine Vitamin B_{12}-abhängige Raktion. Dabei wird die Methylgruppe von 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure auf Homocystein übertragen, wodurch Tetrahydrofolsäure frei wird. Diese ist als Cofaktor für die Aktivierung von C_1-Einheiten und deren Übertragung auf Vorstufen der Purinnukleotide unentbehrlich. Mittelbar wirkt somit das Vitamin B_{12} über den Folsäurestoffwechsel auf die Thymidylat- und DNS-Synthese. (ARNSTEIN, 1956; BOCK et.al., 1967; FLEISCHHACKER, 1961; GOUNELLE u. MARNAY,1960).

Bei Arbeiten mit radioaktiv markiertem Vitamin B_{12} verwendet man am besten ^{57}Co-Vitamin B_{12}, weil hierbei die

Strahlenbelastung am geringsten ist (STÜBER, 1966). Der Vitamin B_{12}-Nachweis wird meist biologisch (ANDERSON, 1964; ARNOLD, 1962; FLEISCHHACKER, 1963; MENDELSOHN u. WATKIN, 1958) oder mit physiko-chemischen Methoden geführt (ROSENTHAL et.al., 1961; STÜBER, 1966). Als Vitamin B_{12}-Resorptionstest dient heute der Schilling-Test (CASTRILLON-OBERNDORFER, 1962).

Ein Vitamin B_{12}-Mangel kann auftreten bei einseitiger vegetarischer Ernährung, bei Vitamin B_{12}-verbrauchenden Zuständen, wie zum Beispiel während einer Schwangerschaft oder während des Wachstumsalters oder bei Vitamin B_{12}-Resorptionsstörungen infolge Erkrankung oder Resektion des Magen-Darm-Traktes (STÜBER, 1966). Ein Vitamin B_{12}-Mangel führt meist zu einer Megaloblasten-Anämie, in einzelnen Fällen auch zu neurologischen und psychischen Störungen, die der Megaloblasten-Anämie um Jahre vorausgehen können (ALEXANDER, 1956; CASTRILLON-OBERNDORFER et.al., 1965; CONRAD, 1960; FLEISCHHACKER, 1962; HOLMES, 1956 und STÜBER, 1966). Das Vitamin B_{12} und die Folsäure können sich für kurze Zeit und nur bis zu einem gewissen Grad ersetzen (BECK, 1962; STÜBER, 1966).

Eine Folge eines Vitamin B_{12}-Mangels ist die Verzögerung der DNS-Synthese und damit eine Verzögerung der Zellreifung, was auch bei der Spermiogenese eine Oligospermie zur Folge haben müßte. Daneben sollte noch eine andere Frage geklärt werden. Bei der CML ist die Vitamin B_{12}-Bindungskapazität meist deutlich erhöht. Da KARYPIDIS (1966) im menschlichen Ejakulat eine außerordentliche hohe Vitamin B_{12}-Bindungskapazität festgestellt hatte, sollte ermittelt werden, wie hoch bei männlichen CML-Patienten der Anteil an kontaminierenden Spermaglykoproteinen ungünstigstenfalls angesetzt werden müßte.

III. Methoden

Es wurden 187 Ejakualte aufgearbeitet, davon 103 nach der Ammoniumsulfat (= A.S.)-Fällungsmethode, 84 nach der Dialysiermethode. Die Ejakulate erhielt ich aus der hiesigen Universitäts-Hautklinik. Sie stammten zum größten Teil von Patienten, die in die Fertilitätssprechstunde gekommen waren, zu einem kleinen Teil von freiwilligen Spendern. Die Ejakulate standen nach der Abgabe, bis sie verflüssigt waren (ca. 20 min). Sodann wurden sie mit einem Rührmagneten ca. 20 min lang bei Zimmertemperatur homogenisiert. Von denjenigen Ejakulaten, die später mit der A.S.-Fällungsmethode weiterverarbeitet wurden, wurde der Rest des Ejaulates, der nach den Routineuntersuchungen (Menge, Spermienzahl, Nativpräparat, pH, Fructose, gefärbtes Spermiogramm) noch übrig geblieben war, in aliquote 1 ml-Portionen (später in 0,5 ml-Potionen) aufgeteilt und mit 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 versetzt und vermischt, so daß die Endlösung 3,1-m war. Die Ansätze wurden bei 4 °C aufbewahrt und nach spätestens 14 Tagen nach einem Schema verarbeitet, das im wesentlichen einem von KARYPIDIS (1966) entwickelten Verfahren zur Bestimmung der Vitamin B_{12}-Bindungskapazität von menschlichem Ejakulat gleicht.

1.) A.S.-Fällungsmethode (Schema I)

A. a) In ein ca. 15 ml fassendes Zentrifugengläschen 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung (pH 3,5) einpipettieren. 1,0 ml Ejakulat zufügen und gründlich vermischen.
   b) 20 min bei 3500 U.p.m. zentrifugieren
   c) Überstand dekantieren und verwerfen
   d) Sediment in 1,0 ml Wasser suspendieren

B. a) Spermienhaltiges Sediment 10 min zentrifugieren. Der Überstand enthält nun die löslichen Proteine einschließlich der Glykoproteine.
b) Sediment zweimal mit je 0,2 ml Wasser waschen und die Überstände mit Überstand "Ba" vereinigen.

C. a) Vereinigte Überstände von "B" mit dem dreifachen Volumen 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 versetzen (= 3,1-m-A.S.-Konzentration). Jetzt enthält das Sediment die B_{12}-bindenden Proteine. Deshalb Überstand verwerfen.

D. a) Sediment "c" in 1,0 ml Wasser lösen. Dann 1,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 zufügen und zentrifugieren (2,1-m-A.S.-Konzentration).
b) Sediment abermals in 1,0 ml Wasser lösen und 1,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 zufügen und zentrifugieren.
c) Vorgang "Db" wiederholen (= 2,05-m-A.S.-Konzentration). Sediment verwerfen, da dieses Albumin und anderes unerwünschtes Protein enthält.

E. a) Zu den vereinigten Überständen "Da - c" 55 ug $CoCl_2$ = (0,02 ml einer 0,5 proz. wäßriger Lösung von $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$) zufügen.

F. a) Pro ml der 2,05-m-A.S.-Lösung "E" 1 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 zusetzen.
b) Proteine abzentrifugieren, Überstand verwerfen.
c) Sediment in 1,0 ml Wasser auflösen.

G. a) 100 ng (= 0,1 µCi) ^{57}Co-Vitamin B_{12} + 900 ng nicht radioaktives Cyanocobalamin zu Ansatz "Fc" hinzufügen und Ansatz vier Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen.
b) Pro 1 ml des Ansatzes "Ga" 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 zufügen, zentrifugieren und Überstand verwerfen.

c) Sediment "Gb" in 1,0 ml Wasser lösen und mit 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung versetzen, zentrifugieren, Überstand verwerfen.

d) "Gc" wiederholen.

H. Sediment "Gd" in 2,0 ml Wasser lösen. Gebundene Radioaktivität zählen und auf Standard umrechnen.

2.) Dieses Schema wurde im Laufe der Untersuchungen in einigen Punkten abgeändert (= A.S.-Fällungsmethode Schema II)

Zu Punkt A: Anstatt 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung wurden 4,6 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 pro 1 ml Ejakulat zugesetzt. Die Endlösung war dann 3,35-m, pH 3,5. Damit konnte eine bessere Fällung des Ejakulates erreicht werden.

Zu Punkt B: Das Sediment wurde zweimal mit je 0,5 ml H_2O gewaschen.

Zu Punkt C: Die vereinigten Überstände wurden mit dem 4,6-fachen Volumen 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 versetzt (3,35 m).

Zu Punkt E: Der Zusatz von $CoCl_2$ sollte

a. das ^{57}Co-Cyanocobalamin in seiner Cyanoform erhalten (SIMONS, 1964)

b. verhindern, daß etwa vorhandene ^{57}Co-Ionen mitgezählt werden und so eine Bindung von ^{57}Co-Vitamin B_{12} vortäuschen könnten. Es zeigte sich, daß der Zusatz von $CoCl_2$ bei der A.S.-Fällungsmethode ohne Einfluß auf das Ergebnis war. Der Zusatz wurde in späteren Aufarbeitungen weggelassen.

Zu Punkt Fa: Das Sediment aus "Fb" wurde in 1 ml ^{57}Co-Vitamin B_{12}-Stammlösung "Ga" aufgenommen und sofort weiterverarbeitet.

Zu Punkt Gb: Das Sediment aus "Gb" wurde in späteren Untersuchungen in 1 ml H_2O aufgenommen.

Die Schritte "Gc", "Gd" und "H" wurden in späteren Untersuchungen weggelassen, weil sich zeigte, daß die gebundene Radioaktivität abnahm, wenn man das Sediment in Wasser aufnahm und nachfolgend mit A.S.-Lösung wieder fällte (= Auslaugeeffekt).

3.) Dialysiermethode

Die ersten Ejakulate, die nach der Dialysiermethode aufgearbeitet wurden, wurden noch vor Zusatz der radioaktiven Stammlösung nach der A.S.-Fällungsmethode (Schema II) bis Schritt "Dc" fraktioniert. Die vereinigten Überstände "Da-Dc" wurden zum Teil noch vor Zusatz der radioaktiven Stammlösung "Ga" gegen 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung dialysiert, um das A.S. zu entfernen, zum Teil wurden sie gleich mit NH_4OH-Lösung neutralisiert und mit 1 ml ^{57}Co-Vitamin B_{12}-Stammlösung "Ga" versetzt. Ab Versuch Nummer 211 wurden die Ansätze eine Stunde bei 37 °C mit dem radioaktiven Vitamin B_{12} inkubiert, in Cellophan$^{(R)}$-Dialysierschläuche (Kalle, Wiesbaden-Biebrich, 20 x 20) eingefüllt und gegen 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung als Außenflüssigkeit dialysiert. Die Dialysierschläuche waren meist über Nacht in 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung eingeweicht. Sie wurden nach Einfüllen des Ansatzes an beiden Enden mit doppeltem Knoten verschlossen und 96 Stunden bei 4 °C gegen 2 Liter 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung dialysiert. Die Außenflüssigkeit wurde täglich, also pro Dialyse viermal, erneuert.

Bei den abschließenden Untersuchungen der Ejakulate nach der Dialysiermethode wurden die Ejakulate nicht mehr mit A.S. fraktioniert, sondern als Vollejakulat mit der Vitamin-B_{12}-Stammlösung beschickt und dialysiert. Ein Arbeitsgang erfolgte dann nach folgender Methode:

a. Abpipettieren von 0,5 ml homogenisiertem Ejakulat in ein 15 ml-Zentrifugenglas. Verschließen und in der Tiefkühltruhe aufbewahren.
b. Auftauen des Ejakulates. Nach 20 min Zusatz von 0,5 ml radioaktiver Vitamin-B_{12}-Stammlösung.
c. Verschließen und eine Stunde lang bei 37 °C inkubieren.
d. Auffüllen mit Aqua dest. oder 0,9 proz. NaCl-Lösung auf 5 ml.
e. Einfüllen in einen in 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung eingeweichten Dialysierschlauch, zweimaliges Nachspülen des Reagenzglases mit je 1,0 ml H_2O oder 0,9 proz. NaCl-Lösung und ebenfalls in den Dialysierschlauch einfüllen.
f. 96 Stunden Dialyse bei 4 °C gegen 2 Liter 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung oder 0,9 proz. NaCl-Lösung. Außenflüssigkeit täglich erneuern.
g. Nach 96-stündiger Dialyse Einfüllen des Schlauchinhaltes in einen 25-ml-Meßzylinder. Nachspülen des Schlauches mit zweimal je 1 ml H_2O oder 0,9 proz. NaCl-Lösung und Einfüllen in den Meßzylinder. Vermischen, dann Zylinderinhalt notieren.
h. Entnahme von 2 ml Dialysat aus dem Meßzylinder. Gebundene Radioaktivität zählen, auf Gesamtvolumen des Dialysats umrechnen und auf Standard beziehen.

In einem späteren Stadium der Dissertation wurden einige Ansätze gegen 0,9 proz. NaCl-Lösung dialysiert, da sich bei der Dialyse gegen 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung ein Sediment bildete, das bei dem als Vergleichsgröße mitlaufenden Humanserum ca. 10 %, beim Ejakulat ca. 7 % der Radioaktivität der Innenflüssigkeit band.

4.) Säulenchromatographie

Die Ejakulate "Nr. 156 und 162" wurden der Säulenaustauschchromatographie unterworfen. Als Austauschergel diente DEAE-Sephadex A 50 (Pharmacia, Uppsala). Als Pufferlösung wurde Trispuffer pH 7,5 verwendet (12,1 g Trispuffersubstanz in 500 ml Wasser lösen. Zusatz von ca. 80 ml 1n-HCl + Aqua dest. ad 2000 ml). Messen des pH.

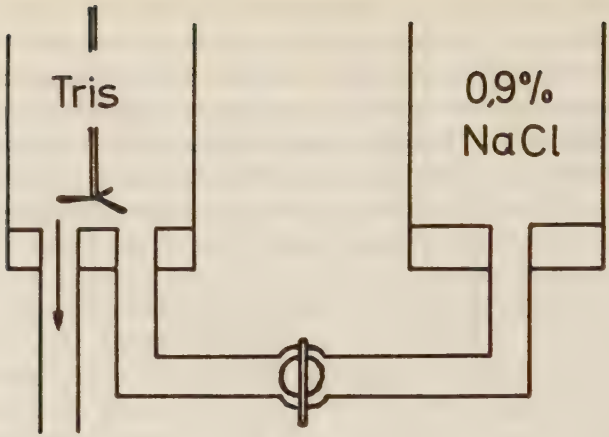
Zu 3 g DEAE-Sephadex A 50-Trockensubstanz wurden ca. 200 ml Trispufferlösung von bekanntem pH zugefügt und über Nacht stehen gelassen. Es entstanden ca. 110 ml Gel. Das Gel wurde so oft mit frischem Puffer gewaschen, bis der Ausgangswert des pH der Pufferlösung wieder erreicht war.

Vor dem Durchlauf durch einen Fraktionssammler (Radirac LKB, Stockholm) wurde jeweils ein orientierender Gläschenvorversuch unternommen. Das zu fraktionierende Ejakulatprotein lag in Trockensubstanz vor, nachdem die einzelnen Ansätze des Ejakulates nach 96 Stunden Dialyse gegen 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung zusammen lyophilisiert worden waren.

1. Eine Flocke der Ejakulatproteintrockensubstanz wurde in ein Reagenzglas eingebracht, in 1 ml Trispufferlösung aufgenommen und die Radioaktivität durch Zählen der Impulse (1) bestimmt.
2. Danach wurden ca. 2 ml Sephadex-Gel und 3 ml Trispufferlösung in das selbe Reagenzglas einpipettiert. Der Reagenzglasinhalt wurde vermischt, zentrifugiert und die Radioaktivität von Sediment und Überstand bestimmt. (2)

Vorgang "2" wurde einige Male wiederholt. Blieb die eingesetzte Radioaktivität im sedimentierten Gel, so wurde anstatt der Trispufferlösung 0,3 - 2,0 proz. NaCl-Lösung zugesetzt und der Vorgang "2" wiederholt. War die Radioaktivität im Überstand jetzt angestiegen, so galt dies als Beweis,

daß durch die ansteigende Ionenstärke im Gel das vorher gebundene Vitamin B_{12}-bindende Glykoprotein aus seiner Bindung mit dem Austauschergel verdrängt wurde. Im nachfolgenden Versuch wurde das untere Ende einer Austauschersäule (1,5 x 30 cm) mit Glaswolle verschlossen. Sodann wurde die Säule von unten luftblasenfrei so weit mit Trispufferlösung gefüllt, bis eine ca. 5 cm hohe Pufferlösungssäule über dem Glaswollepfropf stand. Danach wurden ca. 10 ml Sephadex-Gel in die Austauschersäule einpipettiert. Die gesamte Austauscher- und Sammlerapparatur wurde vor Versuchsbeginn mit Trispufferlösung durchspült. Dann wurde eine bestimmte Menge des lyophilisierten Ejakulatproteins abgewogen, deren Radioaktivität gemessen und in Trispufferlösung aufgelöst. Mit dieser Proteinlösung wurde die dem Sephadex-Gel überstehende Trispufferlösung in der Austauschersäule mit einer Pipette unterschichtet. Auch der obere Teil der Säule wurde luftblasenfrei gefüllt und an den Auslauf der Vorratsgefäße angeschlossen. In eines der beiden Vorratsgefäße war Trispufferlösung eingefüllt, in das andere 2,0 proz. NaCl-Trispufferlösung. Die Oberflächenspiegel beider Gefäße wurden auf gleiche Höhe nivelliert. Die beiden Behälter waren so miteinander und mit der Austauschersäule verbunden, daß die NaCl-Trispufferlösung zuerst in den Behälter mit Trispufferlösung floß und dort von einem Rührwerk gemischt wurde. Damit ließ sich ein linear ansteigender NaCl-Gradient erzielen. Aus dem Behälter mit Trispufferlösung wurde das erhaltene Gemisch der beiden Lösungen durch die Austauschersäule geleitet. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers, der mit einem 5 ml Siphon bestückt war, wurden die einzelnen Fraktionen in Reagenzgläsern aufgefangen. Anschließend wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gezählt.



5.) Immunelektrophoresen

Als Elektrophoresemedium diente zum Teil Agargel mit 1,5 g Special Agar Noble in 100 ml 1 : 5 verdünntem Barbitalpuffer pH 8,6 (LKB-Colora, Lorch), zum Teil Rein-Agar (Behringwerke) in 100 ml 1 : 3 verdünntem Barbitalpuffer pH 8,6. Als Antigen wurden ca. 2 - 4 proz. Ejakulatproteinlösungen in Barbitalpufferlösung hergestellt.

Als Antikörper diente Anti-Humanspermaserum vom Kaninchen (Behringwerke, Marburg) oder Anti-Humanvollserum aus dem Isotopenlabor der hiesigen Medizinischen Klinik (KALLEE).

Die Laufzeit betrug 90 min bei 210 V und 22 mA für einen Ansatz von 18 Objektträgern. Die Präzipitationssicheln waren meist schon 12 Stunden nach Zufügen des Antikörpers ausgebildet. Anschließend wurden die Objektträger 12 Stunden

in eine Lösung von 0,9 proz. NaCl + 0,01 proz. Cialit(R) gelegt, danach zwei Tage lang in destilliertes Wasser, um das nicht-präzipitierte Protein auszuwaschen. Zum Teil wurden die Objektträger nach dem Auswaschen photographiert, zum Teil wurden sie mit Amidoschwarz 10 B gefärbt.

Ein Teil der Objektträger wurde auf Röntgenfilm geklebt und der Selbstbelichtung in Röntgenkassetten überlassen.

6.) Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität kleinerer Volumina (bis 2 ml) wurde im Bohrlochkristall eines Szintillationszählgerätes (Frieseke u. Hoepfner, Erlangen) bestimmt. Von größeren Volumina wurde eine 2-ml-Probe entnommen, deren Radioaktivität bestimmt und dann auf die Gesamtradioaktivität umgerechnet.

IV. Ergebnisse

1.) Bindungswerte bei A.S.-Fällung

A. Aufarbeiten einiger Ejakulate nach der A.S.-Fällungsmethode I. Die Ejakulate "Nr. 1 bis 9" wurden nach der A.S.-Fällungsmethode (Schema I) aufgearbeitet. Von den Ejakulaten "Nr. 3 und 4" lagen jeweils Doppelansätze vor.

Es ergaben sich folgende Bindungswerte:

1 ml Stammlösung enthielt:
100 ng ^{57}Co-Vitamin B_{12} + 900 ng Cyanocobalamin (= Cytobion(R)).
Bei einem Nulleffekt von 450 I.p.m. wurden als Standard 175.500 I.p.m. gezählt.

Bei der Angabe der Bindungswerte wurde vorausgesetzt, daß das radioaktive Vitamin B_{12} und das nichtradioaktive Vitamin B_{12} von den Spermaplasmaproteinen gleichwertig gebunden wurden. Es ergaben sich folgende Bindungswerte:

Nr. 1	231,5 ng/ml	4a	177,0 ng/ml	7	19,9 ng/ml
2	129,0 ng/ml	4b	123,3 ng/ml	8	261,4 ng/ml
3a	233,0 ng/ml	5	238,5 ng/ml	9	99,6 ng/ml
3b	257,9 ng/ml	6	180,8 ng/ml		

Mittelwert $\bar{x}$ = 177,4 ng/ml Standardabweichung s = $\pm$ 77,4

B. Vom Ejakulat "Nr. 14" lagen vier Ansätze vor, die nach dem Schema I der A.S.-Fällungsmethode aufgearbeitet wurden. Zusätzlich wurde jedoch schon nach Schritt "Gc", nachdem das Sediment aus Schritt "Gb", also zum ersten Mal, in 1 ml Wasser aufgenommen worden war, die verbliebene Radioaktivität bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 175.950 I.p.m. Nulleffekt 420 I.p.m.

Erste Fällung mit A.S.:

14a	511,0 ng/ml	14c	426,0 ng/ml	$\bar{x}$ = 464,0
14b	466,0 ng/ml	14d	453,0 ng/ml	s = $\pm$ 35,5

Zweite Fällung mit A.S.:

Entsprechend der A.S.-Fällungsmethode (Schema I) wurden die Ansätze weiter aufgearbeitet. (Zusatz von 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5, vermischen, zentrifugieren, das Sediment in 1 ml Wasser aufnehmen und zählen).

Es ergaben sich folgende Werte:

14a	297,0 ng/ml	14c	230,0 ng/ml	$\bar{x}$ = 256,5
14b	254,0 ng/ml	14d	245,0 ng/ml	S = $\pm$ 28,8

Dritte Fällung mit A.S.:

Entsprechend der A.S.-Fällungsmethode wurden die Ansätze nach Schritt "Gd" aufgearbeitet und das Sediment in 1 ml Wasser zur endgültigen Radioaktivitätsmessung aufgenommen.

Es ergaben sich folgende Werte:

14a	181,0 ng/ml	14c	139,0 ng/ml	$\bar{x}$ = 152,5
14b	148,0 ng/ml	14d	142,0 ng/ml	s = $\pm$ 19,8

Mit den beiden Ansätzen "14a" und "14b" wurde der Auslaugeversuch fortgesetzt. Es sollte festgestellt werden, ob der Wert der Bindungskapazität einem Grenzwert zustrebte, oder ob sich die gesamte Radioaktivität auswaschen ließ.

Es ergaben sich folgende Werte:

1. zusätzliche Fällung:	14a	105,0 ng/ml
	14b	84,5 ng/ml
2. zusätzliche Fällung:	14a	52,0 ng/ml
	14b	48,0 ng/ml
3. zusätzliche Fällung:	14a	25,6 ng/ml
	14b	21,4 ng/ml

(graphische Darstellung siehe Anhang Abbildung I)

Das Ergebnis eines später durchgeführten Auslaugeversuches sei hier gleich vorweggenommen. Entsprechend dem Vorgehen bei den Ejakulaten "Nr. 14" wurden die Ejakulate "Nr. 84b, 84c, 108b, 109b" aufgearbeitet.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard: 107.144 I.p.m. Nulleffekt 431 I.p.m.

Schritt "Gc":	84b	780,0 ng/ml	108b	804,0 ng/ml
	84c	760,0 ng/ml	109b	881,0 ng/ml

Schritt "Gd":	84b	528,0 ng/ml	108b	555,0 ng/ml
	84c	541,0 ng/ml	109b	705,0 ng/ml
Endgültige Zählung:				
	84b	341,0 ng/ml	108b	368,0 ng/ml
	84c	384,0 ng/ml	109b	535,0 ng/ml
1. zusätzliche Fällung:				
	84b	256,0 ng/ml	108b	274,0 ng/ml
	84c	292,0 ng/ml	109b	348,0 ng/ml
2. zusätzliche Fällung:				
	84b	124,0 ng/ml	108b	142,0 ng/ml
	84c	165,0 ng/ml	109b	264,0 ng/ml
3. zusätzliche Fällung:				
	84b	77,0 ng/ml	108b	90,0 ng/ml
	84c	113,0 ng/ml	109b	194,0 ng/ml
4. zusätzliche Fällung:				
	84b	49,0 ng/ml	108b	59,0 ng/ml
	84c	76,0 ng/ml	109b	144,0 ng/ml
5. zusätzliche Fällung:				
	84b	32,0 ng/ml	108b	37,0 ng/ml
	84c	52,0 ng/ml	109b	104,0 ng/ml
6. zusätzliche Fällung:				
	84b	21,3 ng/ml	108b	25,0 ng/ml
	84c	36,0 ng/ml	109b	82,0 ng/ml
7. zusätzliche Fällung:				
	84b	12,0 ng/ml	108b	15,0 ng/ml
	84c	23,0 ng/ml	109b	63,0 ng/ml

(graphische Darstellung siehe Anhang Abbildung II)

C. Abänderung der Methode in einigen Punkten.

Nachdem mit dem "Auslaugeversuch" gezeigt worden war, daß der Wert der Bindungskapazität nicht einem Grenzwert zustrebte, sondern sich die gesamte Radioaktivität auswaschen ließ, wurde angenommen, daß es sich bei der Vitamin B_{12}-Bindung um eine labile Bindung handeln müsse, die in wäßriger Lösung und unter dem Einfluß von A.S.-Lösung im sauren Bereich leicht gespalten wird. Deshalb wurde die Methode (A.S.-Fällungsmethode I) in folgenden Punkten abgeändert:

a. Der Schritt "Fc" fällt weg. Das Sediment aus Schritt "Fb" wird sofort in 1 ml Stammlösung aufgenommen.

b. Nach Schritt "Ga" wird der Ansatz nicht mehr vier Stunden stehen gelassen. Nach Zusatz der Stammlösung und Vermischen werden gleich 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 zugefügt.

c. Schritt "Gc" bis "H" fallen weg. Nach Aufnahme des Sedimentes in 1 ml Stammlösung, Zusatz von A.S.-Lösung, Vermischen, Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes, wird das Sediment in 1 ml Wasser aufgenommen, die Radioaktivität gezählt und auf den Standard umgerechnet. Nach dieser abgeänderten Methode wurden die folgenden Ejakulate aufgearbeitet.

Standard 206.500 I.p.m.		Nulleffekt 460 I.p.m.	
10	658,0 ng/ml	24a	613,0 ng/ml
13	704,0 ng/ml	24b	612,0 ng/ml
15	673,0 ng/ml	25	523,0 ng/ml
16a	679,0 ng/ml	26	321,0 ng/ml
16b	712,0 ng/ml	27	645,0 ng/ml
18	614,0 ng/ml	28	657,0 ng/ml
19	621,0 ng/ml	29	693,0 ng/ml
20a	524,0 ng/ml	30	538,0 ng/ml
20b	557,0 ng/ml	31	698,0 ng/ml
21a	630,0 ng/ml	32	610,0 ng/ml
21b	679,0 ng/ml	33	648,0 ng/ml
21c	702,0 ng/ml	34	539,0 ng/ml
22a	524,0 ng/ml	35	597,0 ng/ml
22b	537,0 ng/ml	36a	450,0 ng/ml
23	728,0 ng/ml	36b	572,0 ng/ml
$\bar{x}$ = 609,0 ng/ml		s = $\pm$ 88,8 ng/ml	

D. Aufarbeiten von Ejakulaten nach der abgeänderten Methode, jedoch mit halben Mengen.

Von den nachfolgenden Ejakulaten wurden nur jeweils 0,5 ml (anstatt 1 ml) homogenisiertes Ejakulat in ein Reagenzglas einpipettiert und mit 1,5 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 gefällt. Somit konnten vom gleichen Probanden mehrere Ansätze aufgearbeitet werden.

Standard 95.700 I.p.m.		Nulleffekt 520 I.p.m.	
37	643,0 ng/ml	44	674,0 ng/ml
38	672,0 ng/ml	45	485,0 ng/ml
39	691,0 ng/ml	46	666,0 ng/ml
40	602,0 ng/ml	47	577,0 ng/ml
42a	592,0 ng/ml	48	478,0 ng/ml
42b	622,0 ng/ml	49	613,0 ng/ml

43a	643,0 ng/ml	50	596,0 ng/ml
43b	487,0 ng/ml	51	561,0 ng/ml
52	582,0 ng/ml	65a	708,0 ng/ml
53a	526,0 ng/ml	65b	698,0 ng/ml
53b	408,0 ng/ml	66	643,0 ng/ml
54a	249,0 ng/ml	67	796,0 ng/ml
54b	352,0 ng/ml	68	805,0 ng/ml
55	374,0 ng/ml	69	812,0 ng/ml
56	672,0 ng/ml	71a	657,0 ng/ml
57a	498,0 ng/ml	71b	660,0 ng/ml
57b	513,0 ng/ml	71c	632,0 ng/ml
58	738,0 ng/ml	73a	740,0 ng/ml
59	590,0 ng/ml	73b	649,0 ng/ml
60	670,0 ng/ml	73c	685,0 ng/ml
61a	678,0 ng/ml	74a	508,0 ng/ml
61b	610,0 ng/ml	74b	528,0 ng/ml
61c	670,0 ng/ml	74c	493,0 ng/ml
62a	614,0 ng/ml	75	823,0 ng/ml
62b	632,0 ng/ml	76a	628,0 ng/ml
63	667,0 ng/ml	76b	568,0 ng/ml
64	733,0 ng/ml	76c	515,0 ng/ml

Mittelwert $\bar{x}$ = 613,0 Standardabweichung s = $\pm$ 105,1
(Alle Bindungswerte sind auf 1 ml Ejakulat bezogen.)

E. Aufarbeiten eines Mehrfachansatzes

Vom Ejakulat "Nr. 77" lagen neun 0,5-ml-Portionen vor. Es sollte untersucht werden, inwieweit mit der A.S.-Fällungsmethode eine Konstanz der Bindungswerte erreicht werden kann.

Standard 115.700 I.p.m.		Nulleffekt 440 I.p.m.	
77a	585,0 ng/ml	77f	773,0 ng/ml
77b	482,0 ng/ml	77g	606,0 ng/ml
77c	553,0 ng/ml	77h	568,0 ng/ml
77d	578,0 ng/ml	77i	523,0 ng/ml
77e	322,0 ng/ml		

Trotz sorgfältigen Aufarbeitens nach der abgeänderten A.S.-Fällungsmethode Schema I (Versuch C) konnten keineswegs konstante Ergebnisse erhalten werden. Es fiel jedoch auf, daß die Überstände aus Schritt "Fb" opalescent waren. Sie wurden deshalb getrennt aufgefangen und durch Zusatz von je 3,0 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 auf 3,35-m gebracht. Nach Vermischen wurde 10 min zentrifugiert und, da die Überstände klar waren, dekantiert. Bei allen Ansätzen hatte sich ein Sediment gebildet. Diese wurden je in 0,5 ml frisch angesetzter Vitamin B_{12}-Stammlösung (= 50 ng ^{57}Co B_{12} + 450 ng Cyanocobalamin) aufgenommen, mit je 1,5 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 versetzt, vermischt, zentrifugiert, das Sediment in 0,5 ml Wasser aufgenommen und gezählt.

Es ergaben sich folgende Werte:

(in Klammern jeweils die Vitamin B_{12}-Bindungswerte nach der ersten Aufarbeitung)

77a	308,0 ng/ml	(585,0 ng/ml)
77b	407,0 ng/ml	(482,0 ng/ml)
77c	196,0 ng/ml	(553,0 ng/ml)
77d	151,0 ng/ml	(578,0 ng/ml)
77e	489,0 ng/ml	(322,0 ng/ml)
77f	116,0 ng/ml	(773,0 ng/ml)
77g	103,0 ng/ml	(606,0 ng/ml)
77h	363,0 ng/ml	(568,0 ng/ml)
77i	428,0 ng/ml	(523,0 ng/ml)

Die Ergebnisse der Ejakulate "77a" bis "77i" zeigten, daß auch noch bei einer höheren A.S.-Molarität als 3,1-m bei pH 3,5 Vitamin B_{12}-bindende Proteine ausfallen können. Deshalb wurde die A.S.-Fällungsmethode Schema I ein zweitesmal abgeändert.

F. Aufarbeiten von Ejakulatansätzen nach der A.S.-Fällungsmethode bei einer oberen Fraktionierungsgrenze von 3,35-m bei pH 3,5.

Von den folgenden Ejakulaten wurden 0,5 ml-Portionen nach der A.S.-Fällungsmethode aufgearbeitet, wobei durch entsprechend mehr Zusatz von 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 die obere Grenze der Molarität auf 3,35-m gehoben wurde, während die untere Grenze bei 2,1-m belassen wurde.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 94.300 I.p.m.		Nulleffekt 250 I.p.m.	
68	805,0 ng/ml	80f	831,0 ng/ml
69	850,0 ng/ml	81a	740,0 ng/ml
75	845,0 ng/ml	81b	722,0 ng/ml
79a	705,0 ng/ml	81c	790,0 ng/ml x
79b	702,0 ng/ml	92a	890,0 ng/ml
79c	736,0 ng/ml x	92b	869,0 ng/ml
80a	840,0 ng/ml	92c	867,0 ng/ml
80b	847,0 ng/ml	92d	865,0 ng/ml
80c	828,0 ng/ml	92e	868,0 ng/ml
80d	812,0 ng/ml	92f	883,0 ng/ml
80e	803,0 ng/ml	92g	890,0 ng/ml

Bei den Ansätzen "79c" und "81c" wurde als einzige der gesamten Gruppe in Schritt "Dc" das Sediment noch ein viertesmal in 1 ml Wasser aufgenommen und mit 1 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 versetzt und gefällt (gekennzeichnet mit x). Dadurch gelangte vermutlich mehr Ejakulatprotein in den Überstand als bei den Vergleichsansätzen. Beide Ansätze zeigen jedenfalls jeweils den höchsten Bindungswert in ihrer Gruppe. Dadurch lag die Vermutung nahe, daß der Wert der Bindungskapazität wesentlich von der Menge des Proteins abhing, die in Schritt "Fb" gefällt wurde.

G. Aufarbeiten von Ejakulatplasmen.

Die homogenisierten Ejakulate Nr. "107, 108 und 109" wurden vor Aufteilung in 0,5-ml-Portionen 15 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden in 0,5-ml-Portionen aufgeteilt und nach der A.S.-Fällungsmethode zwischen den Molaritätsgrenzen 2,1 und 3,35 bei pH 3,5 fraktioniert. Die Vollejakulate "Nr. 82, 83, 84, 85 und 87" wurden nach der selben Methode aufgearbeitet.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 107.300 I.p.m.		Nulleffekt 210 I.p.m.	
82	740,0 ng/ml	84c	762,0 ng/ml
83	799,0 ng/ml	85	797,0 ng/ml
84a	769,0 ng/ml	87	730,0 ng/ml
84b	780,0 ng/ml		
107a	778,0 ng/ml	109a	855,0 ng/ml
107b	776,0 ng/ml	109b	882,0 ng/ml
107c	790,0 ng/ml x	109c	859,0 ng/ml x
108a	751,0 ng/ml	109d	868,0 ng/ml x
108b	802,0 ng/ml x		

Die Bindungswerte der Seminalplasmen lagen also im Bereich der Bindungswerte der Vollejakulate.

Die Ansätze der Seminalplasmen "107c", "108b", "109c" und "109d" blieben in Schritt "Gb" (nach Zusatz von 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung und von 2,5 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5) 90 min stehen, um eventuelle Verluste durch Diffusion des Vitamin B_{12} in das wässerige Medium zu erfassen (gekennzeichnet mit x). Die übrigen Ansätze wurden gleich weiterverarbeitet. Die Ergebnisse bestätigten den Verdacht einer Abdiffusion von Vitamin B_{12} nicht.

H. Einfluß der Art der Vitamin B_{12}-Stammlösung auf die Höhe der Bindungskapazität

Es wurde untersucht, ob die prozentuale Zusammensetzung der Stammlösung aus ^{57}Co Vitamin B_{12} und Cyanocobalamin Einfluß auf das Ergebnis der Bindungskapazität hat.

Von den Ejakulaten "100" und "103" lagen jeweils sechs Ansätze zu 0,5 ml vor.

Es wurden 11 ml der bisherigen Stammlösung (100 ng ^{57}Co-Vitamin B_{12} und 900 ng Cytobion pro 1 ml Ejakulat) angesetzt. Zu den Sedimenten der Ansätze "100a" und "103a" wurden jeweils 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung einpipettiert. Zu den verbleibenden 10 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung wurde 1 ml Cyanocobalamin-Lösung mit 1000 ng Cyanocobalamin (Cytobion$^{(R)}$) zugegeben und vermischt. Von dieser somit entstandenen Vitamin B_{12}-Stammlösung wurden wieder jeweils 0,5 ml zu den Sedimenten der Ansätze "100b" und "103b" gegeben, zu den verbleibenden 10 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung wurde wieder 1 ml Cyanocobalamin-Lösung mit 1000 ng Cyanocobalamin gegeben usw.

So ergaben sich folgende Vitamin B_{12}-Konzentrationen für die einzelnen Ansätze:

100a u. 103a 100ng ^{57}Co B_{12} + 909ng Cyanocobalamin/ml Ejakulat
100b u. 103b 91ng ^{57}Co B_{12} +1738ng Cyanocobalamin/ml Ejakulat
100c u. 103c 83ng ^{57}Co B_{12} +2486ng Cyanocobalamin/ml Ejakulat
100d u. 103d 75ng ^{57}Co B_{12} +3176ng Cyanocobalamin/ml Ejakulat
100e u. 103e 68ng ^{57}Co B_{12} +3792ng Cyanocobalamin/ml Ejakulat
100f u. 103f 63ng ^{57}Co B_{12} +4338ng Cyanocobalamin/ml Ejakulat

Anders als bei den bisherigen Angaben des Bindungswertes wird diesmal nur der Wert des radioaktiven Vitamin B_{12} angegeben, das im Sediment gebunden war. Da bei den einzelnen Ansätzen das Verhältnis von radioaktivem ^{57}Co Vitamin B_{12} und nicht-radioaktivem Cyanocobalamin nicht konstant war und auch die absoluten Mengen von Vitamin B_{12} in den einzelnen Ansätzen nicht gleich waren, würden absolute Bindungswerte nur verwirren. Zudem kam es nur darauf an zu zeigen, ob bei einer Zunahme des nicht-radioaktiven Anteiles von Vitamin B_{12} in der Stammlösung der im Sediment gebundene Anteil von radioaktivem ^{57}Co Vitamin B_{12} absinken würde.

Die Bindungswerte des radioaktiven Vitamins B_{12} wurden in Beziehung gesetzt zu den Standardwerten der einzelnen Ansätze und in Prozenten ausgedrückt.

Es ergaben sich folgende Werte: Nulleffekt 27 I.p.m.

Ansatz	Standard	Sediment	Bindungswert in %
100a	76.430	64.020	83,8 %
100b	69.550	57.750	83,1 %
100c	63.750	52.770	82,7 %
100d	60.530	49.560	81,8 %
100e	52.150	43.320	83,1 %
100f	48.620	40.040	82,4 %
103a	74.990	63.980	85,3 %
103b	69.650	58.470	83,8 %
103c	63.230	52.210	82,5 %
103d	58.240	48.540	83,3 %
103e	52.490	44.180	84,2 %
103f	49.000	40.840	83,4 %

Der erwartete Effekt, daß die Ansätze mit steigender Cyanocobalaminkonzentration niedrigere Bindungswerte zeigen würden, trat nicht ein. Dieses Ergebnis bestärkte den Verdacht, daß es sich bei der A.S.-Fällungsmethode um eine unspezifische Vitamin B_{12}-"Bindung" handeln müsse, vielleicht um eine Aussalzung von Vitamin B_{12} zusammen mit Proteinen. Damit würde auch verständlich, warum Vitamin B_{12} sich aus dem Komplex wieder herauswaschen ließ.

I. Untersuchungen mit Gamma-Globulinlösung

Nach den Ergebnissen der Ansätze "77a" bis "77i" und der Ansätze "79c" und "81c" wurde vermutet, daß die Höhe der Bindungskapazitätswerte bei der A.S.-Fällungsmethode eher von der Menge des in Schritt "Gb" gefällten Proteins abhing als von der Art des Proteins. Es wurde deshalb als Kontrolle eine 1,6 proz. Gamma-Globulinlösung (Rind, Behring-Werke) angesetzt. Je 1 ml dieser Lösung wurde in ein Reagenzglas pipettiert, mit 1 ml 4,1-m-A.S.-Lösung versetzt, vermischt und zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung aufgenommen, mit 2,5 ml 4,1-m-A.S.-Lösung versetzt, vermischt, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und die Radioaktivität bestimmt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 97.430 I.p.m.		Nulleffekt 460 I.p.m.	
Ansatz 1	853,0 ng/ml	Ansatz 4	805,0 ng/ml
Ansatz 2	880,0 ng/ml	Ansatz 5	822,0 ng/ml
Ansatz 3	822,0 ng/ml		

Damit bestätigte sich die Vermutung, daß bei der A.S.-Fällungsmethode nicht die Art des Proteins entscheidend ist, welches das Vitamin B_{12} binden soll, sondern wahrscheinlich die Menge des Proteins, welches in Schritt "Gb" gefällt wird.

J. Ergänzende Untersuchungen zur A.S.-Fällungsmethode

a. Einfluß der Proteinmenge auf die Höhe des "Bindungskapazitätswertes".

Es wurde eine Gamma-Globulin-Verdünnungsreihe angesetzt. Von jeder Konzentrationsstufe wurden jeweils drei 0,5 ml-Ansätze hergestellt. Die einzelnen Ansätze wurden wie in Versuch "I" aufgearbeitet.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 96.430 I.p.m. Nulleffekt 30 I.p.m.

Gamma-Globulin Konzentration	Ansatz	Bindungswert
1,6 proz.	1	751,0 ng/ml
	2	772,0 ng/ml
	3	805,0 ng/ml
0,8 proz.	1	750,0 ng/ml
	2	749,0 ng/ml
	3	750,0 ng/ml
0,4 proz.	1	620,0 ng/ml
	2	620,0 ng/ml
	3	618,0 ng/ml
0,2 proz.	1	465,0 ng/ml
	2	448,0 ng/ml
	3	440,0 ng/ml

0,1 proz.	1	286,0 ng/ml
	2	320,0 ng/ml
	3	252,0 ng/ml
0,05 proz.	1	182,0 ng/ml
	2	192,0 ng/ml
	3	193,0 ng/ml
0,025 proz.	1	68,0 ng/ml
	2	80,0 ng/ml
	3	63,0 ng/ml
0,0125 proz.	1	42,0 ng/ml
	2	53,0 ng/ml
	3	44,0 ng/ml

(graphische Darstellung s. Anhang Tab. III)

b. Es wurde untersucht, in welchen Schritten Vitamin B_{12} bindendes Protein bei der A.S.-Fällungsmethode verloren geht.

Vom Ejakulat "160" lagen zwei Ansätze vor:

0,5 ml homogenisiertes Vollejakulat = 160 VE
das Sediment von 0,5 ml Ejakulat "160", nachdem dieses durch Zusatz von 2,3 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 gefällt worden war
= 160 AE (Ammoniumsulfat - Ejakulat)

Beide Ansätze wurden noch vor Beginn der Aufarbeitung nach der A.S.-Fällungsmethode (Schema II) mit je 1 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung versetzt. Dann wurde nach der A.S.-Fällungsmethode zwischen den Fraktionierungsgrenzen 2,1-m und 3,35-m aufgearbeitet. In den einzelnen Schritten wurde jeweils die Radioaktivität der Überstände bzw. der Sedimente gemessen.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 61.180 I.p.m. Nulleffekt 27 I.p.m.

Schritt "Ac": Der Überstand beider Ansätze wurde nicht gemessen.

Schritt "Ad": Sediment "160 VE" 47.460 I.p.m.
Sediment "160 AE" 46.970 I.p.m. (Kontrolle)

Schritt "Bb": Sediment "160 VE" 1.717 I.p.m.
Sediment "160 AE" 3.256 I.p.m. (werden verworfen)
Vereinigte Überstände
"160 VE" 45.291 I.p.m.
"160 AE" 44.576 I.p.m. (Kontrolle)

Schritt "C": Überstand "160 VE" 8.858 I.p.m.
"160 AE" 10.008 I.p.m. (werden verworfen)

Schritt "Dc": Sediment "160 VE" 7.453 I.p.m.
Sediment "160 AE" 2.933 I.p.m. (werden verworfen)

Schritt "E": Vereinigte Überstände
"160 VE" 23.685 I.p.m.
"160 AE" 25.962 I.p.m. (Kontrolle)

Schritt "Fb": Überstand "160 VE" 7.946 I.p.m.
"160 AE" 8.965 I.p.m. (werden verworfen)

Schritt "Fc": Sediment "160 VE" 11.463 I.p.m.
Sediment "160 AE" 11.386 I.p.m. (endgültige Zählung)

In den einzelnen Schritten gingen somit an Radioaktivität verloren:

Schritt "Ac" (Überstand): "160 VE" 23 %
"160 AE" 22,2 %

Schritt "Bb" (Sediment): "160 VE" 2,8 %
"160 AE" 5,3 %

Schritt "C"	(Überstand):	"160 VE"	14,4 %
		"160 AE"	16,2 %
Schritt "Dc"	(Sediment):	"160 VE"	12,1 %
		"160 AE"	4,8 %
Schritt "Fb"	(Überstand):	"160 VE"	12,9 %
		"160 AE"	14,5 %

Die hauptsächlichen Verluste treten also beim Dekantieren von Überständen auf (Schritt "Ac", "C", "Fb").

Die Überstände von "160 VE" und "160 AE" aus Schritt "Bb" wurden in Wasser aufgelöst und vereinigt, ebenso die Sedimente aus Schritt "Dc". Alle vereinigten Überstände und Sedimente wurden 96 Stunden gegen 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung als Außenflüssigkeit dialysiert. Die Außenflüssigkeiten wurden täglich gewechselt.

c. Die Dialysate wurden lyophilisiert, die Trockensubstanzen gewogen, in 1 ml Wasser aufgenommen und gezählt.

Es ergaben sich folgende Werte: Nulleffekt 24 I.p.m.

Sediment	"Bb"	10,7 mg	1363 I.p.m.=127 I.p.m./mg
Überstand	"C"	3,5 mg	343 I.p.m.= 98 I.p.m./mg
Sediment	"Dc"	15,2 mg	4711 I.p.m.=310 I.p.m./mg
Überstand	"Fb"	2,9 mg	270 I.p.m.= 93 I.p.m./mg
Sediment	"Fc"	13,8 mg	3310 I.p.m.=240 I.p.m./mg

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen:

1. Entweder lag das ^{57}Co-Vitamin B_{12} in den Überständen des Auslaugeversuches in freier Form vor oder es war an dialysierbare Proteine gebunden, so daß es also in beiden Fällen in die Außenflüssigkeit entweichen konnte (vergleiche Versuch "B").

2. Die A.S.-Fällungsmethode scheint in der durchgeführten Form der Fraktionierung zu keiner spezifischen Anreicherung von Vitamin B_{12}-bindendem, nichtdialysierbarem Glykoprotein zu führen. Beispielsweise band das Sediment "Dc" mehr ^{57}Co-Vitamin B_{12}/mg als das Sediment "Fc", das eigentlich die Vitamin B_{12}-bindenden Glykoproteine enthalten sollte.

Zusammengefaßt zeigen die Versuche, daß die A.S.-Fällungsmethode allein nicht dazu geeignet ist, die Vitamin-B_{12}-Bindungskapazität der Glykoproteine in proteinreichen Lösungen zu bestimmen:

1. Mit dem Auslaugeversuch konnte gezeigt werden, daß der Wert der "Bindungskapazität" keinem Grenzwert zustrebt, sondern sich die gesamte Radioaktivität auslaugen läßt (Versuch "B").

2. Die Höhe des Bindungskapazitätswertes scheint mehr von der Menge des in Schritt "Gb" gefällten Proteins abzuhängen als von der Art des Proteins (Versuch "F", Versuch "I").

3. Die Zusammensetzung der Vitamin B_{12}-Stammlösung und das Verhältnis der Mengen von ^{57}Co Vitamin B_{12} und Cyanocobalamin hat auf die Höhe des Bindungskapazitätswertes keinen Einfluß (Versuch "H").

4. Die "Bindungswerte" einer 1,6 proz.-Gamma-Globulinlösung liegen im Bereich der "Bindungswerte" der Ejakulate. (Versuch "I").

2.) Bindungswerte bei Dialyse

Orientierende Versuche (Bis Versuch I enthielt 1 ml der Vitamin B_{12}-Stammlösung 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng Cytobion(R)).

A. Einfluß der Konzentration des Ejkulatproteins auf die Bindungskapazität.

Die nachfolgenden Ejakulate wurden nach der A.S.-Fällungsmethode bis Schritt "Fc" fraktioniert. Das Sediment aus Schritt "Fc" wurde in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (100 ng ^{57}Co Vitamin B_{12} + 900 ng Cyanocobalamin/ml) aufgenommen und mit Wasser auf 5,0 ml aufgefüllt. Alle Proben wurden mit NH_4OH ungefähr auf pH 7,0 eingestellt. Die Ansätze "c_1" und "c_2" wurden durch Halbieren eines Ansatzes "c" in Schritt "Dc" gewonnen. Sie enthielten also nur die halbe Proteinmenge.

Als Vergleichswerte wurden vier Ansätze mit Gamma-Globulinlösung mitdialysiert.

G_1: 0,5 ml 1,6 proz. Gamma-Glubulinlösung (Rind, Behringwerke)
G_2 u. G_3: je 1 ml 1,6 proz. Gamma-Globulinlösung (Rind, Behringwerke)
G_4: 2 ml 1,6 proz. Gamma-Globulinlösung (Rind, Behringwerke)

Alle Ansätze wurden 72 Stunden bei 4 °C gegen zwei Liter Cialit(R)-Lösung als Außenflüssigkeit dialysiert. Die Außenflüssigkeit wurde alle 24 Stunden gewechselt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 74.740 I.p.m.		Nulleffekt 21 I.p.m.	
93a	30,2 ng/ml	98a	19,5 ng/ml
93b	28,6 ng/ml	98b	18,2 ng/ml
$93c_1$	20,3 ng/ml	$98c_1$	16,0 ng/ml
$93c_2$	19,9 ng/ml	$98c_2$	16,9 ng/ml
96a	6,8 ng/ml	99a	19,4 ng/ml
96b	8,5 ng/ml	99b	13,5 ng/ml
$96c_1$	4,5 ng/ml	$99c_1$	11,5 ng/ml
$96c_2$	5,0 ng/ml	$99c_2$	10,7 ng/ml
G_1	10,1 ng/ml	G_3	14,1 ng/ml
G_2	14,5 ng/ml	G_4	18,9 ng/ml

Alle Ansätze "96" wurden versehentlich bei ca. 60 °C dialyisiert.

B. Einfluß der A.S.-Fraktionierung auf die B_{12}-Bindungskapazität.

Es wurden folgende Versuche angesetzt:

a. "119a - e", "120a - d" und "121d u. e" wurden nach A.S.-Fällungsmethode Schema II bis Schritt "Dc" aufgearbeitet und dann mit je 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) beschickt.

b. Die Ansätze "121a - c" waren Vollejakulate, die ohne vorhergehende Fraktionierung in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) aufgenommen wurden.

c. "VS_1", "VS_2" und "VS_3" waren Humanseren, die ohne vorhergehende Fraktionierung in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) aufgenommen wurden.

d. "GS_1", "GS_2" und "GS_3" waren Humanseren, die mit A.S.-Lösung gefällt worden waren. Das Sediment wurde jeweils in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) aufgenommen.

e. "FS_1", "FS_2" und "FS_3" waren Humanseren, die nach der A.S.-Fällungsmethode Schema II bis Schritt "Dc" fraktioniert worden waren. Das Sediment wurde jeweils in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) aufgenommen.

(x) = (= 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng B_{12}/ml Lösung)

Die Ansätze wurden folgendermaßen auf die einzelnen Dialysierflaschen verteilt:

Flasche 1: "119a", "120a", "121a", "VS_1", "GS_1"
Flasche 2: "119b", "120b", "121b", "VS_2", "GS_2"
Flasche 3: "119c", "120c", "121c", "VS_3", "GS_3"
Flasche 4: "119d", "120d", "121d", "FS_1", "FS_2"
Flasche 5: "119e", "121e", "FS_3"

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 68.540 I.p.m. Nulleffekt 23 I.p.m.

Flasche 1:	"119a"	"120a"	"121a"	"VS_1"	"GS_1"
	14,4ng/ml	15,7ng/ml	37,0ng/ml	39,4ng/ml	10,5ng/ml
Flasche 2:	"119b"	"120b"	"121b"	"VS_2"	"GS_2"
	13,6ng/ml	16,6ng/ml	42,0ng/ml	37,5ng/ml	12,5ng/ml
Flasche 3:	"119c"	"120c"	"121c"	"VS_3"	"GS_3"
	15,9ng/ml	19,3ng/ml	40,5ng/ml	41,7ng/ml	16,5ng/ml
Flasche 4:	"119d"	"120d"	"121d"	"FS_1"	"FS_2"
	12,2ng/ml	13,4ng/ml	10,1ng/ml	2,4ng/ml	3,9ng/ml
Flasche 5:	"119e"	"121e"	"FS_1"		
	20,5ng/ml	12,6ng/ml	5,8ng/ml		

Ergebnisse:

1. Die nichtfraktionierten Ejakulatansätze "121a - c" zeigen ca. dreimal höhere Bindungswerte als die fraktionierten Vergleichswerte "121d" u. "121e".

2. Die Humanseren ergaben einen Mittelwert von 39,5 ng/ml, die mit A.S. gefällten Seren einen Mittelwert von 13,2 ng/ml und die fraktionierten Seren einen Mittelwert von 4,0 ng/ml.

Eine gegenseitige Beeinflussung der einzelnen Ansätze in den verschiedenen Flaschen ließ sich nicht nachweisen.

C. Einfluß der A.S.-Fällung auf die Bindungskapazität

Die Ansätze "147a - c", "149a - c", "154a u. b", "155a - c", "157a u. b" und "163a u. b" waren je 0,5 ml homogenisiertes Humanejakulat, die jeweils mit 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) versetzt wurden.

Die Ansätze "147A u. B", "149A u. B", "154A u. B", "155A u. B", "157A u. B" und "163A u. B" waren je 0,5 ml homogenisiertes Humanejakulat, die mit je 2,5 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 gefällt worden waren. Die Sedimente wurden jeweils in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) aufgenommen. Als Vergleichswerte wurden je drei Ansätze von 0,5 ml Humanserum und drei Ansätze von 0,5 ml einer 1,6 proz. Gamma-Globulinlösung mit je 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) versetzt und bei 4 °C dialysiert. Dialysedauer: 72 Stunden.

(x) = (= 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng B_{12}/ml Lösung)

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 86.010 I.p.m.		Nulleffekt 58 I.p.m.	
147A	117,0 ng/ml	147a	141,0 ng/ml
147B	110,0 ng/ml	147b	141,0 ng/ml
		147c	146,0 ng/ml
149A	85,0 ng/ml	149a	119,0 ng/ml
149B	80,0 ng/ml	149b	124,0 ng/ml
		149c	114,0 ng/ml
154A	85,0 ng/ml	154a	134,0 ng/ml
154B	84,5 ng/ml	154b	143,0 ng/ml
155A	62,0 ng/ml	155a	106,0 ng/ml
155B	73,5 ng/ml	155b	108,0 ng/ml
		155c	110,0 ng/ml
157A	107,0 ng/ml	157a	173,0 ng/ml
157B	128,0 ng/ml	157b	179,0 ng/ml
163A	94,5 ng/ml	163a	172,0 ng/ml
163B	106,0 ng/ml	163b	164,0 ng/ml
VS_1	56,5 ng/ml	G_1	7,9 ng/ml
VS_2	58,0 ng/ml	G_2	9,4 ng/ml
VS_3	54,0 ng/ml	G_3	8,3 ng/ml

Es zeigt sich, daß die Humanejakulate aller Gruppen jeweils höhere Bindungswerte ergeben als die entsprechenden mit A.S. behandelten Ansätze.

D. Versuch über den Einfluß der A.S.-Fällung auf die Höhe des Bindungskapazitätswertes.

a. Die Ansätze "138a u. b" und "143a u. b" wurden mit je 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) versetzt und dialysiert.

b. Für die Ansätze "138" und "143" waren je 0,5 ml Humanejakulat mit je 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) versetzt und anschließend mit je 4,6 ml 4,1-m-A.S.-Lösung gefällt worden. Die Sedimente wurden jeweils in 5,0 ml Wasser aufgenommen und dialysiert.

c. Die Ansätze "138A - D" und "143A, B u. C" waren je 0,5 ml Humanejakulat, die v o r Zusatz der Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) mit je 2,5 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 gefällt worden waren. Die Sedimente wurden je in 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) aufgenommen, mit Wasser auf 0,5 ml aufgefüllt und dialysiert.

(x) = (= 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng B_{12}/ml Lösung)

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 56.520 I.p.m.		Nulleffekt 35 I.p.m.	
138a	172,0 ng/ml	143a	129,0 ng/ml
138b	160,0 ng/ml	143b	125,0 ng/ml
138	173,0 ng/ml	143	121,0 ng/ml
138A	108,0 ng/ml	143A	111,0 ng/ml
138B	107,0 ng/ml	143B	102,0 ng/ml
138C	96,0 ng/ml	143C	98,0 ng/ml
138D	99,0 ng/ml		

Fällung des Ejakulates mit A.S. v o r Zusatz der Vitamin B_{12}-Stammlösung ergibt niedrigere Bindungskapazitätswerte als unbehandelte Humanejakulatansätze.

Fällung des Ejakulates n a c h Zusatz der Vitamin-B_{12}-Stammlösung scheint ohne Einfluß auf das Ergebnis des Bindungskapazität zu sein.

E. Einfluß der Dialyse bei A.S.-gefällten Humanseren vor Zusatz der Vitamin B_{12}-Stammlösung.

Es wurden zehnmal jeweils 0,5 ml Humanserum angesetzt. Alle Ansätze wurden mit je 2,5 ml 4,1-m-A.S.-Lösung pH 3,5 versetzt und gefällt. Die Ansätze "GS_1 - GS_4" wurden vor Zusatz der Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) nicht dialysiert, die Ansätze "GS_5 - GS_{10}" wurden vor Zusatz der Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) 96 Stunden gegen 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung dialysiert.

(x) = (= 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng B_{12}/ml Lösung)

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 71.290 I.p.m.		Nulleffekt 60 I.p.m.	
GS_1	10,5 ng/ml	GS_5	16,8 ng/ml
GS_2	8,5 ng/ml	GS_6	14,4 ng/ml
GS_3	10,7 ng/ml	GS_7	13,7 ng/ml
GS_4	9,6 ng/ml	GS_8	14,1 ng/ml
		GS_9	16,0 ng/ml
		GS_{10}	17,1 ng/ml

Diejenigen Seren, die vor dem Zusatz von Vitamin B_{12} dialysiert wurden, zeigten höhere Bindungswerte als die nicht-dialysierten Seren.

F. Einfluß der Dialysedauer auf die Bindungskapazität

16 Ansätze zu je 0,5 ml Humanserum wurden mit jeweils 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (100 ng ^{57}Co Vitamin B_{12} + 900 ng Cyanocobalamin/ml) versetzt. Je ein Ansatz wurde in einem 250 ml-Meßzylinder gegen 100 ml einer 0,01 proz.-Cialit$^{(R)}$-Lösung als Außenflüssigkeit dialysiert (ohne Rührwerk). Nach bestimmten

Zeitintervallen wurde von einem Ansatz bestimmt:

a. die Radioaktivität in der Außenflüssigkeit
b. die Radioaktivität des Dialysates.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 63.692 I.p.m. Nulleffekt 60 I.p.m.

Erster Wechsel nach 6 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 14 Messungen): 26.927 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 16:
42.305 I.p.m. = 665,0 ng/ml

Zweiter Wechsel nach insgesamt 12 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 13 Messungen): 11.389 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 15:
31.054 I.p.m. = 468,0 ng/ml

Dritter Wechsel nach insgesamt 18 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 12 Messungen): 6.633 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 14:
19.659 I.p.m. = 308,0 ng/ml

Vierter Wechsel nach insgesamt 35 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 11 Messungen): 7.920 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 13:
11.592 I.p.m. = 182,0 ng/ml

Fünfter Wechsel nach insgesamt 54 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 10 Messungen): 3.034 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 12:
6.912 I.p.m. = 108,0 ng/ml

Sechster Wechsel nach insgesamt 66 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 9 Messungen): 1.360 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 11:
6.168 I.p.m. = 97,0 ng/ml

Siebenter Wechsel nach insgesamt 90 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 8 Messungen): 1.310 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 10:
4.232 I.p.m. = 66,0 ng/ml

Achter Wechsel nach insgesamt 116 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 7 Messungen): 530 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 9:
3.985 I.p.m. = 62,5 ng/ml

Neunter Wechsel nach insgesamt 140 Stunden Dialysierdauer:
Radioaktivität der Außenflüssigkeit (Querschnitt aus 6 Messungen): 410 I.p.m./100 ml Außenflüssigkeit
Noch enthaltene Radioaktivität im Dialysat Nr. 8:
3.084 I.p.m. = 47,0 ng/ml

Nach 140 Stunden Dialysedauer wurde der Versuch beendet, da kaum noch Radioaktivität in der Außenflüssigkeit nachzuweisen war. Bei den restlichen Ansätzen wurden noch folgende Vitamin B_{12}-Bindungswerte gemessen.

S_1	51,5 ng/ml	S_5	42,7 ng/ml
S_2	48,5 ng/ml	S_6	41,7 ng/ml
S_3	55,5 ng/ml	S_7	48,7 ng/ml
S_4	52,8 ng/ml	S_8	49,5 ng/ml

Mittelwert $\bar{x}$ = 48,9 ng/ml Standardabweichung s = $\pm$ 4,7 ng/ml
(graphische Darstellung siehe Anhang Tabelle IV)

G. Einfluß der Temperatur während der Dialyse auf die Höhe der Bindungswerte.

Angesetzt wurden 15 Leerwerte (je 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) wurden in 4,5 ml Wasser aufgenommen) und 15 Standardansätze (je 0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) wurden in 4,0 ml Wasser aufgenommen).

(x) = (= 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng B_{12}/ml Lösung)

Je 5 Ansätze wurden in einer Flasche gegen 2 Liter 0,01 proz.-Cialit$^{(R)}$-Lösung dialysiert.

Je eine Flasche mit 5 Leerwerten bzw. 5 Standardansätzen wurde bei 4 °C, bei Zimmertemperatur und bei ca. 60 °C dialysiert. Die Außenflüssigkeit wurde täglich gewechselt.

L 4 ° = Leerwert bei 4 °C L 20 ° = Leerwert bei Zimmertemp.
L 60 ° = Leerwert bei 60 °C

S 4 ° = Serum bei 4 °C S 20 ° = Serum bei Zimmertemp.
S 60 ° = Serum bei 60 °C

Es ergaben sich folgende Werte:

	Standard 72.646 I.p.m.		Nulleffekt 58 I.p.m.		
	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
L 4 °	6,1ng/ml	5,5ng/ml	4,6ng/ml	4,3ng/ml	3,4ng/ml
L 20 °	5,1ng/ml	4,3ng/ml	4,1ng/ml	3,0ng/ml	2,1ng/ml
L 60 °	2,9ng/ml	1,7ng/ml	1,5ng/ml	0,3ng/ml	0,4ng/ml
S 4 °	49,7ng/ml	39,2ng/ml	42,3ng/ml	39,1ng/ml	34,4ng/ml
S 20 °	28,5ng/ml	28,3ng/ml	22,0ng/ml	24,1ng/ml	13,7ng/ml
S 60 °	16,2ng/ml	10,4ng/ml	8,1ng/ml	6,3ng/ml	8,2ng/ml

(graphische Darstellung siehe Anhang Tabelle V)

H. Einfluß von Verdünnung und Temperatur während der Inkubation.

Angesetzt wurden:

6 Ansätze zu je 0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x). 3 Ansätze davon wurden 1 Stunden bei 4 °C inkubiert, die anderen 3 Ansätze wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

6 Ansätze zu je 0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) + 4,0 ml Wasser. 3 Ansätze wurden 1 Stunde bei 4 °C, die anderen 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

6 Ansätze zu je 0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x) + 4,0 ml Wasser. 3 Ansätze wurden 1 Stunde bei 4 °C, die anderen 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

(x) = (= 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng B_{12}/ml Lösung)

Alle Ansätze wurden 96 Stunden bei 4 °C dialysiert.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 63.097 I.p.m.			Nulleffekt 22 I.p.m.		
1,0 ml, 4 °C	S_1	47,1 ng/ml	1,0 ml, 37 °C	S_1	81,0 ng/ml
	S_2	46,0 ng/ml		S_2	67,5 ng/ml
	S_3	44,2 ng/ml		S_3	72,5 ng/ml
2,5 ml, 4 °C	S_1	45,2 ng/ml	2,5 ml, 37 °C	S_1	61,0 ng/ml
	S_2	41,8 ng/ml		S_2	65,5 ng/ml
	S_3	44,7 ng/ml		S_3	65,0 ng/ml
5,0 ml, 4 °C	S_1	44,7 ng/ml	5,0 ml, 37 °C	S_1	68,0 ng/ml
	S_2	39,6 ng/ml		S_2	65,0 ng/ml
	S_3	36,8 ng/ml		S_3	64,1 ng/ml

(graphische Darstellung siehe Anhang Tabelle VI)

Der Versuch zeigt:

1. Bei höherer Temperatur während der Inkubationszeit resultiert ein höherer endgültiger Bindungswert.
2. Bei fallender Konzentration der Vitamin B_{12}-Stammlösung und des Ejakulatproteins resultiert ein niedrigerer Bindungswert.

I. Einfluß der Inkubationsdauer auf die Höhe der Bindungswerte.

Angesetzt wurden:

6 mal je 0,5 ml einer 1,6 proz.-Gamma-Globulinlösung + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x)

6 mal je 0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x)

2 mal je 0,5 ml Humanejakulat Nr. "155" + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x)

2 mal je 0,5 ml Humanejakulat Nr. "156" + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (x)

(x) = (= 100 ng ^{57}Co B_{12} + 900 ng B_{12}/ml Lösung)

Die Hälfte aller Ansätze wurde nach Zusatz der Vitamin B_{12}-Stammlösung sofort in Dialysierschläuche gefüllt und dialysiert. Die andere Hälfte blieb nach Zusatz der Vitamin B_{12}-Stammlösung noch fünf Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wurde erst dann in Dialysierschläuche gefüllt und dialysiert (gekennzeichnet mit x).

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 60.740 I.p.m.		Nulleffekt 20 I.p.m.	
G_1	27,0 ng/ml	G_1 x	58,1 ng/ml
G_2	31,7 ng/ml	G_2 x	59,4 ng/ml
G_3	29,0 ng/ml	G_3 x	54,6 ng/ml
S_1	84,0 ng/ml	S_1 x	118,0 ng/ml
S_2	85,0 ng/ml	S_2 x	116,0 ng/ml
S_3	80,0 ng/ml	S_3 x	127,0 ng/ml
155	212,0 ng/ml	155 x	232,0 ng/ml
156	243,0 ng/ml	156 x	168,0 ng/ml

(graphische Darstellung siehe Anhang Tabelle VII)

Der Versuch zeigt, daß mit zunehmender Inkubationsdauer auch die Bindungskapazitätswerte anstiegen.

J. Einfluß der spezifischen Radioaktivität der Vitamin B_{12}-Stammlösung.

Es wurde untersucht, ob ein Unterschied im Ergebnis der Bindungskapazität auftritt, wenn man als Vitamin B_{12}-Stammlösung

a. nur 50 ng ^{57}Co B_{12} pro 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung oder

b. 50 ng ^{57}Co B_{12} + 450 ng Cyanocobalamin pro 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung verwendet.

Angesetzt wurden zehn 0,5 ml-Portionen Humanserum und 0,5 ml-Portionen der nachfolgend aufgezählten Ejakulate. Die Hälfte aller Ansätze wurde mit der Vitamin B_{12}-Stammlösung I (nur 50 ng ^{57}Co B_{12} pro 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung), die andere Hälfte mit der Vitamin B_{12}-Stammlösung II versetzt. Alle Ansätze wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend 96 Stunden bei

4 °C gegen zwei Liter Cialit(R)-Lösung als Außenflüssigkeit dialysiert.

Es ergaben sich folgende Werte:

Vitamin B_{12}-Stammlösung I:
Standard 32.660 I.p.m. Nulleffekt 20 I.p.m.

Vitamin B_{12}-Stammlösung II:
Standard 31.860 I.p.m. Nulleffekt 20 I.p.m.

Als Bindungswerte wurden diesmal bei beiden Gruppen nur die Mengen des gebundenen ^{57}Co Vitamin B_{12}/ml Ejakulat angegeben, um die beiden Ergebnisgruppen besser vergleichen zu können.

Alle Ansätze mit Vitamin B_{12}-Stammlösung I (nur 50 ng ^{57}Co B_{12}/0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung)		Alle Ansätze mit Vitamin B_{12}-Stammlösung II (50 ng ^{57}Co B_{12} + 450 ng Cyanocobalamin/0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung)	
S_1	10,5 ng/ml	S_1	11,5 ng/ml
S_2	11,4 ng/ml	S_2	10,5 ng/ml
S_3	10,1 ng/ml	S_3	9,8 ng/ml
S_4	10,6 ng/ml	S_4	10,8 ng/ml
S_5	10,6 ng/ml	S_5	9,4 ng/ml
158a	17,6 ng/ml		
158b	17,9 ng/ml		
200a	19,5 ng/ml	200b	7,1 ng/ml
		200c	7,1 ng/ml
165a	22,1 ng/ml	165c	8,0 ng/ml
165b	20,0 ng/ml	165d	8,9 ng/ml

Es wäre zu erwarten gewesen, daß alle Ansätze mit der Vitamin B_{12}-Stammlösung II niedrigere Bindungswerte aufweisen als die entsprechenden Vergleichsansätze, die mit der Vitamin B_{12}-Stammlösung I versetzt worden waren, denn das Vitamin B_{12} der Stammlösung II enthielt eine zehnmal geringere spezifische Radioaktivität als die Stammlösung I. Der erwartete Effekt trat aber nur bei den Ejakulaten ein, nicht bei den Serumansätzen. Da dies nicht erklärt werden konnte, wurde der Versuch wiederholt.

Die Aufarbeitung und die Messung der Bindungswerte der folgenden Ansätze erfolgte ebenso wie im vorhergehenden Versuch.

Alle Ansätze mit Vitamin B_{12}-Stammlösung I (nur 50 ng ^{57}Co B_{12}/0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung)		Alle Ansätze mit Vitamin B_{12}-Stammlösung II (50 ng ^{57}Co B_{12} + 450 ng Cyanocobalamin/0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung)	
S_1	10,3 ng/ml	S_1	10,7 ng/ml
S_2	10,5 ng/ml	S_2	10,2 ng/ml
S_3	9,4 ng/ml	S_3	11,3 ng/ml
S_4	9,9 ng/ml	S_4	11,3 ng/ml
168a	24,1 ng/ml	168a	8,4 ng/ml
168b	21,9 ng/ml	168b	9,5 ng/ml
168c	21,6 ng/ml	168c	8,9 ng/ml
170a	27,2 ng/ml	170a	9,8 ng/ml
170b	24,4 ng/ml	170b	11,2 ng/ml
170c	23,5 ng/ml	170c	9,4 ng/ml
170d	24,2 ng/ml	170d	11,0 ng/ml

Der Versuch bestätigte das Ergebnis des vorhergehenden Versuches. Beide Versuche zeigen, daß ein Zusatz von nichtradioaktivem Cyanocobalamin bei Humanseren keinen Einfluß auf die Menge des gebundenen radioaktiven Vitamin B_{12} hat, während ein solcher bei Ejakulatansätzen deutlich hervortritt. Die Transcobalamine des Serums scheinen also die beiden Vitamin B_{12}-Substanzen verschiedenartig zu adsorbieren, während die Sperma-Glykoproteine offenbar radioaktives und nichtradioaktives Vitamin B_{12} gleichartig binden. Dadurch kommt es zu einem Rückgang der Bindungskapazität des radioaktiven Vitamins B_{12} bei Zusatz von nichtradioaktivem Vitamin B_{12} zur Vitamin B_{12}-Stammlösung.

Außerdem wäre zu diskutieren, daß das ^{57}Co Vitamin B_{12} nicht identisch ist mit dem nichtradioaktiven Cyanocobalamin.

K. Radioaktivität im Sediment, das sich bei der Dialyse mit 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung bildete.

Es war bei den vorhergehenden Dialysen aufgefallen, daß sich bei der Dialyse mit 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung in den einzelnen Dialysierschläuchen nach 96 Stunden Dialyse ein Sediment wechselnder Menge gebildet hatte. Alle Dialysate des Versuches "J" wurden deshalb zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Radioaktivität des Sedimentes gezählt.

Die Bindungswerte der Sedimente wurden jeweils auf die Impulszahl des Gesamtdialysates des betreffenden Ansatzes bezogen.

Es ergaben sich folgende Werte: Nulleffekt 23 I.p.m.

Ansätze mit Vitamin B_{12}-Stammlösung I		Ansätze mit Vitamin B_{12}-Stammlösung II	
S_1	9,3 %	S_1	9,9 %
S_2	8,9 %	S_2	9,3 %
S_3	10,8 %	S_3	11,0 %
S_4	8,5 %	S_4	9,2 %
168a	4,1 %	168a	5,9 %
168b	6,1 %	168b	7,2 %
168c	6,3 %	168c	8,3 %
170a	2,3 %	170a	4,4 %
170b	6,1 %	170b	5,1 %
170c	5,0 %	170c	5,9 %
170d	8,1 %	170d	6,3 %

Der Versuch zeigt, daß von den Sedimenten der Humanseren mehr Radioaktivität gebunden wird ($\bar{x}$ = 9,8) als von den Sedimenten der Ejakulate ($\bar{x}$ = 5,8).

L. Verbleibende Radioaktivität in den Dialysierschläuchen.

Es wurde untersucht, wieviel Prozent der Radioaktivität des Gesamtdialysates nach Entleeren und Nachspülen der Dialysierschläuche in diesen verbleibt. Zehn entleerte Dialysierschläuche aus dem Versuch "K" wurden je in ein Reagenzglas gestopft und die Radioaktivität bestimmt.

Es ergaben sich folgende Werte: Nulleffekt 21 I.p.m.

Schlauch 1:	0,9 %	Schlauch 6:	2,0 %
Schlauch 2:	1,2 %	Schlauch 7:	1,1 %
Schlauch 3:	1,7 %	Schlauch 8:	1,8 %
Schlauch 4:	0,7 %	Schlauch 9:	1,5 %
Schlauch 5:	2,3 %	Schlauch 10:	1,3 %

Der Versuch zeigt, daß die Adsorption von Vitamin B_{12} an Cellophan kaum meßbar war und vernachlässigt werden konnte.

Nach diesen orientierenden Untersuchungen über verschiedenartige Einflüsse auf die Höhe des Bindungskapazitätswertes bei der Dialysiermethode wurde folgende Methode festgesetzt, nach der die Ejakulatansätze untersucht wurden.

1. Es wird nicht mehr mit der A.S.-Fällungsmethode fraktioniert. Von einem homogenisierten Ejakulat werden 0,5 ml in ein Reagenzglas einpipettiert. Der Ansatz wird bis zur Aufarbeitung in einer Kühltruhe eingefroren.

2. Die Ejakulatportionen werden 20 min bei Zimmertemperatur in einem Wasserbad aufgetaut und dann sofort mit 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (= 50 ng $^{57}CoB_{12}$) versetzt.

3. Vermischen des Ansatzes, Verschließen und eine Stunde Inkubieren bei 37 °C.

4. Auffüllen des Ansatzes mit Aqua dest. auf 5,0 ml.

5. Einfüllen des Ansatzes in einen Dialysierschlauch, der über Nacht in 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung eingeweicht war. Nachspülen des Reagenzglases mit zweimal je 1,0 ml Aqua dest. und Einfüllen in den Dialysierschlauch. Verschließen des Schlauches mit doppeltem Knoten.

6. 96 Stunden Dialyse bei 4 °C gegen zwei Liter 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung als Außenflüssigkeit. Täglicher Wechsel der Dialysierflüssigkeit. Alle Dialysen werden mit Rührwerk durchgeführt.

7. Nach 96 Stunden Dialyse Dialysierschlauchinhalt in einen Meßzylinder einfüllen, zweimaliges Nachspülen des Dialysierschlauches mit je 1 ml Aqua dest. und Notieren der Dialysatmenge.

8. Vermischen und Entnahme von zwei ml Dialysat in ein Reagenzglas.

9. Zählen der Impulszahl des 2 ml Anteils. Umrechnen auf Gesamtdialysatmenge und auf Standard beziehen.

Nach dieser standardisierten Methode wurden die Ejakulatansätze der folgenden Probanden untersucht. Alle Ejakulate stammten von Patienten der Fertilitätssprechstunde der hiesigen Universitäts-Hautklinik. Die physiologisch-chemischen Werte der Ejakulate waren dort jeweils aus dem selben Ejakulat gewonnen worden, das auch zur Bestimmung der Vitamin B_{12}-Bindungskapazität verwendet wurde. Von jedem Patienten wurden zwei Ansätze aufgearbeitet und der Mittelwert der beiden Bindungswerte in die Tabelle eingetragen. Als Vergleichswerte wurden jeweils einige Ansätze vom selben Humanserum dialysiert. Beide Ansätze eines Ejakulates wurden gemeinsam in einer Flasche dialysiert.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard: 32.790 I.p.m.		Nulleffekt 60 I.p.m.	
211	23,4 ng/ml	216	37,2 ng/ml
211'	26,2 ng/ml	216'	38,8 ng/ml
212	12,2 ng/ml	217	23,9 ng/ml
212'	11,9 ng/ml	217'	24,2 ng/ml
213	18,0 ng/ml	218	52,0 ng/ml
213'	16,8 ng/ml	218'	52,3 ng/ml
214	11,7 ng/ml	219	13,4 ng/ml
214'	12,6 ng/ml	219'	12,2 ng/ml

215	12,8 ng/ml	220	22,2 ng/ml
215'	13,9 ng/ml	220'	17,5 ng/ml
S_1	7,5 ng/ml	S_3	6,9 ng/ml
S_2	7,3 ng/ml	S_4	7,6 ng/ml
221	14,1 ng/ml	227	17,7 ng/ml
221'	14,6 ng/ml	227'	18,4 ng/ml
222	14,8 ng/ml	228	19,1 ng/ml
222'	10,1 ng/ml	228'	18,1 ng/ml
223	19,3 ng/ml	229	18,6 ng/ml
223'	18,1 ng/ml	229'	19,6 ng/ml
224	18,2 ng/ml	230	27,4 ng/ml
224'	18,1 ng/ml	230'	28,0 ng/ml
225	8,5 ng/ml	231	14,2 ng/ml
225'	7,6 ng/ml	231'	14,2 ng/ml
226	21,6 ng/ml		
226'	18,2 ng/ml		
S_1	7,9 ng/ml	S_3	6,8 ng/ml
S_2	7,8 ng/ml	S_4	7,4 ng/ml
232	19,9 ng/ml	238	24,0 ng/ml
232'	19,9 ng/ml	238'	21,6 ng/ml
233	16,1 ng/ml	239	12,8 ng/ml
233'	14,6 ng/ml	239'	13,6 ng/ml
234	31,4 ng/ml	240	18,3 ng/ml
234'	28,6 ng/ml	240'	15,3 ng/ml
235	21,4 ng/ml	241	22,4 ng/ml
235'	22,6 ng/ml	241'	23,4 ng/ml
236	16,8 ng/ml	242	14,5 ng/ml
236'	15,3 ng/ml	242'	14,5 ng/ml
237	22,8 ng/ml	243	15,6 ng/ml
237'	23,2 ng/ml	243'	15,4 ng/ml
S_1	7,6 ng/ml	S_3	7,6 ng/ml
S_2	7,4 ng/ml	S_4	7,4 ng/ml

Vom Dialysat des Ansatzes "242" und vom Dialysat des Ansatzes "243" wurden je vier weitere 2-ml-Chargen abpipettiert und gezählt. Es sollte geprüft werden, inwieweit die Proben streuen.

Es ergaben sich folgende Werte:

242a	595 I.p.m./2 ml	243a	544 I.p.m./2 ml
242b	626 I.p.m./2 ml	243b	549 I.p.m./2 ml
242c	599 I.p.m./2 ml	243c	556 I.p.m./2 ml
242d	586 I.p.m./2 ml	243d	527 I.p.m./2 ml

(Alle Ansätze wurden 10 min gezählt.)

Bei den bisher nach der standardisierten Methode aufgearbeiteten Ansätzen hatte sich bei der Dialyse gegen 0,01 proz. Cialit(R)-Lösung meist ein Sediment im Dialysierschlauch gebildet. Die folgenden Ansätze wurden deshalb gegen 0,9 proz. NaCl-Lösung dialysiert. Von allen Ejakulaten wurde je ein dritter Ansatz als Vergleichswert wie bisher gegen 0,01 proz. Cialit(R)-Lösung dialysiert.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 31.700 I.p.m. Nulleffekt 60 I.p.m.

244	15,1 ng/ml	
244'	14,5 ng/ml	(16,1 ng/ml)
245	18,1 ng/ml	
245'	18,6 ng/ml	(18,9 ng/ml)
246	20,7 ng/ml	
246'	20,4 ng/ml	(21,3 ng/ml)
247	10,6 ng/ml	
247'	11,0 ng/ml	(9,3 ng/ml)
S_1	4,8 ng/ml	(6,4 ng/ml)
S_2	5,1 ng/ml	(6,9 ng/ml)

Die Werte in Klammern geben jeweils den Bindungswert des dritten Ansatzes an, der gegen 0,01 proz. Cialit(R)-Lösung dialysiert wurde.

Für die Serumansätze für diesen und die folgenden Versuche wurde ein anderes Poolserum verwendet als bei den bisherigen Serumvergleichsansätzen. Dieses Serum scheint weniger Vitamin B_{12} zu binden als das bis Ejakulat Nr. "243" verwendete Humanserum.

Die Dialysate aller Ansätze wurden zentrifugiert, die Überstände dekantiert und die Radioaktivität der Sedimente bestimmt. Als Bezugswert wurde jeweils die Impulszahl des Gesamtdialysates des entsprechenden Ansatzes herangezogen.

Es ergaben sich folgende Werte:

Sedimente der in 0,9 proz. NaCl-Lösung dialysierten Ansätze		Sedimente der in 0,01 proz. Cialit(R)-Lösunng dialysierten Ansätze	
244	5,9 %	244	8,0 %
244'	6,1 %		
245	3,2 %	245	8,9 %
245'	4,1 %		
246	3,0 %	246	5,0 %
246'	3,3 %		
247	4,4 %	247	10,3 %
247'	4,6 %		
S_1	2,4 %	S_1	15,7 %
S_2	2,5 %	S_2	13,9 %

Bei Humanserumansätzen und Humanejakulatansätzen band das sich bildende Sediment weniger radioaktives Vitamin B_{12}, wenn man 0,9 proz. NaCl-Lösung bei der Dialyse als Außenflüssigkeit verwendete.

Von den folgenden Ejakulatansätzen wurden deshalb jeweils zwei gegen 0,9 proz. NaCl-Lösung dialysiert und ein Ansatz zum Vergleich gegen 0,01 proz. Cialit(R)-Lösung. Die Radioaktivität der Sedimente, die sich während der Dialyse bildeten, wurde ebenfalls gemessen.

Nr. des Ansatzes	Bindungswert des Ansatzes bei 0,9 proz. NaCl-Lösung	Radioaktivität im Sediment (0,9 proz. NaCl)	Bindungswert des Ansatzes bei 0,01 proz. Cialit(R)-Lösung	Radioaktivität im Sediment (0,01 proz. Cialit(R)-Lösung
248	13,1 ng/ml	4,2 %	15,5 ng/ml	9,4 %
248'	15,2 ng/ml	6,5 %		
249	19,7 ng/ml	3,4 %	18,2 ng/ml	11,8 %
249'	19,4 ng/ml	2,6 %		
250	30,2 ng/ml	3,8 %	26,2 ng/ml	15,0 %
250'	30,4 ng/ml	3,4 %		
251	26,4 ng/ml	1,8 %	22,8 ng/ml	10,7 %
251'	24,0 ng/ml	2,4 %		
252	51,0 ng/ml	1,6 %		
252'	52,8 ng/ml	3,8 %		
253	31,4 ng/ml	3,4 %		
253'	32,0 ng/ml	3,7 %		
S_1	3,3 ng/ml	3,4 %		
S_2	3,5 ng/ml	2,0 %		
S_3	3,8 ng/ml	4,7 %		
S_4	3,3 ng/ml	6,2 %		

Nr. des Ansatzes	Bindungswert des Ansatzes bei 0,9 proz. NaCl-Lösung	Radioaktivität im Sediment (0,9 proz. NaCl)	Bindungswert des Ansatzes bei 0,01 proz. Cialit(R)-Lösung	Radioaktivität im Sediment (0,01 proz. Cialit(R)-Lösung
254	15,3 ng/ml	1,7 %	13,2 ng/ml	4,3 %
254'	14,0 ng/ml	2,6 %		
255	22,1 ng/ml	3,1 %	21,8 ng/ml	6,9 %
255'	23,8 ng/ml	1,4 %		
256	17,6 ng/ml	1,0 %	17,6 ng/ml	9,3 %
256'	18,7 ng/ml	3,6 %		
257	14,8 ng/ml	1,6 %	16,0 ng/ml	13,4 %
257'	14,8 ng/ml	3,1 %		
258	17,6 ng/ml	2,7 %	16,8 ng/ml	9,3 %
258'	20,6 ng/ml	1,0 %		
259	18,0 ng/ml	3,2 %	17,7 ng/ml	17,5 %
259'	17,3 ng/ml			
260	13,9 ng/ml	2,1 %	13,1 ng/ml	19,3 %
260'	12,8 ng/ml			
261	10,9 ng/ml	1,1 %	11,8 ng/ml	10,4 %
261'	11,2 ng/ml			
262	24,1 ng/ml	4,1 %		
262'	23,6 ng/ml			
263	12,6 ng/ml	3,2 %	14,7 ng/ml	8,7 %
263'	14,2 ng/ml			
264	14,5 ng/ml	3,1 %	13,3 ng/ml	9,6 %
264'	15,1 ng/ml			
S_1	3,5 ng/ml	1,8 %		
S_2	3,5 ng/ml	2,0 %		

Die Serum-Ansätze, die gegen 0,01 proz.-Cialit(R)-Lösung dialysiert wurden, ergaben höhere Bindungswerte als die gegen 0,9 proz.-NaCl-Lösung dialysierten Ansätze.

Die Bindungskapazitätswerte von Ejakulatansätzen, die gegen 0,9 proz.-NaCl-Lösung und gegen 0,01 proz.-Cialit(R)-Lösung dialysiert wurden, unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Deshalb konnten alle Bindungskapazitätswerte, sowohl die, die bei Dialyse gegen 0,01 proz.-Cialit(R)-Lösung als auch die, die bei Dialyse gegen 0,9 proz.-NaCl-Lösung gewonnen wurden, in die nachfolgende Tabelle übernommen werden. Die Bindungswerte in den Sedimenten, die sich während der Dialyse gegen 0,01 proz.-Cialit(R)-Lösung, bzw. gegen 0,9 proz.-NaCl-Lösung gebildet hatten, unterschieden sich sowohl bei Ejakulat - als auch bei Serumansätzen signifikant voneinander.

Auf den folgenden Seiten (61 - 73) sind die spermiographischen und klinischen Daten der Patienten, von denen die Ejakulate stammten, tabellarisch aufgeführt.

In der Tabelle verwendete Abkürzungen:

KW	= Kinderwunsch	NrE	= Nr. d. Ejakulates
VK	= vener. Erkrankungen	BKE	= Bindungskapazität des Ejakulates
H	= Hoden	GD	= Geburtsdatum des Probanden
NH	= Nebenhoden	ME	= Menge des Ejakulates
Pro.	= Prostata	SA	= Spermienanzahl
Nic.	= Nicotin	Np	= Nativpräp.
Alc.	= Alkohol	Sg	= Spermiogramm
		IF	= Init. Fructose

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
211	24,8	4.3.37	5,0	7,6	68,5	50 %	72 %	2937

KW: seit 1 Jahr; VK: keine, Mumps: -; Vita sex.: o. B.; H: bds etwas unter Norm;
NH u. Pro.: o. B.; keine Vorstufen;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
212	12,1	18.8.41	5,0	7,5	118	70 %	81,5 %	2294

VK: keine, Mumps: -; Nic.: 25 Zig./die; Alc.: kaum; H: bds. schlecht tonisiert; einige Vorstufen;

213	17,4	6.2.34	9,0	7,5	0,01	0 %	30 %	2260

KW: seit 6 Jahren; VK: - Mumps: + als Kind; Pot. coeund.: seit 2,5 Jahren vermindert; H: noch im Normbereich; Pro.: o. B.; mehrere Vorstufen;

214	12,2	23.10.29	7,0	7,2	1,2	5 %	64 %	2160

VK: - Mumps: - Pot. coeund.: +; H: li. Größe und Konsistenz vermindert;

215	13,4	19.11.40	9,0	8,0	13,0		59 %	3110

KW: seit 1 Jahr; VK: 1963, 4 Wo. Ausfluß (?); Mumps: mit 8 Jahren; hohe Stimme; Alc.: -; Nic.: kaum; H: unt. Norm, mäßig ton.; vereinzelte Vorstufen;

216	38,0	5.8.37	4,0	8,1	8,5	70 %	58,5 %	1190

Varicocele li.; H: li. wenig tonisiert; einige Vorstufen;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
217	24,1	30.7.41	3,5	8,0	220		83 %	2900

KW: seit 1 1/2 Jahren; Alc.: kaum; Nic.: 12/die; H: bds. im Normbereich; vereinzelte Vorstufen;

218	52,15		5,0	7,9	146		84 %	2800

keine Vorstufen;

219	12,9	24.1.45	3,0	7,5	7,6	50 %	74,5 %	2074

KW: seit 1/2 Jahr; VK: -; Mumps: -; H: bds. unt. Normgrenze; NH: im Kopf kirschkerngroßes Infiltrat; ganz vereinzelt Vorstufen;

220	19,85	17.6.39	3,0	7,5	141	85 %	87 %	622

VK: -; Mumps: -; H: bds. gut tonisiert; NH: o. B.; Pro.: o. B.; keine Vorstufen; Ehefrau hatte vor 1 Jahr Abort;

221	14,35	15.5.41	8,0	7,6	30,4	45 %	78 %	3535

KW: seit 3 1/2 Jahren; Mumps mit 12 Jahren; H: bds. unter d. Norm; - re. schlecht tonisiert; Pro.: o. B.; Alc.: kaum; Nic.: 35/die; ganz vereinzelt Vorstufen;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
222	12,45	17.8.42	6,0	8,0	0	0	0	3570
KW: seit 1 1/2 Jahren; VK: -; Mumps: -; H: o. B., evtl. etw. gering tonisiert; Alc.: kaum; Nic.: 15/die; ganz vereinzelt Vorstufen;								
223	18,7	19.2.38	3,0	8,5	30	34 %	60 %	2780
KW: seit 5 Jahren; Vita sex. vermindert; 1961 NH-Tbc; Pro.: o. B. Potenzstörungen; einige Vorstufen;								
224	18,15	10.12.37	10,0	7,6	25	10 %	32 %	3290
KW: seit 2 Jahren; einige Vorstufen; bei der Ehefrau wurde n. einer Tubargravidität eine Tube entfernt;								
225	8,05	12.9.30	5,0	7,3	82	40 %	81 %	2428
VK: -; Mumps: -; H: pflaumengroß, gut tonisiert; NH: o. B.; ganz vereinzelt Vorstufen;								

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
226	19,9	14.10.34	7,0	7,6	18	5 %	62 %	3020

KW: seit 2 Jahren; Potenz und Libido: o. B.; H: re untere Normgrenze, li Tonus unter der Norm; Pro.: o. B.; einige Vorstufen;

227	18,05	25.11.28	3,0	8,5	2,5	5 %	44,5 %	3229

reichlich Vorstufen;

228	18,9		2,5	7,7	82		85 %	2989

KW: seit 1 1/2 Jahren; VK: -; Mumps: -; Tbc: -; H: bds. kleinzwetschgengroß; NH: o. B.; Pro.: li Lappen derb infiltriert; keine Vorstufen;

229	19,1		4,0	7,5	520	30 %	86 %	576

keine Vorstufen;

230	27,7	15.5.40	5,0	7,4	4,8	0 %	18 %	711

KW: seit 5 Jahren; VK: -; Mumps: -; H: bds. ungewöhnlich gut tonisiert und entwickelt; NH und Samenstrang: o. B.; Pro.: normal groß; etwas weich; viele Vorstufen;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
231	14,2	26.7.41	7,0	7,7	13,8	30 %	74,5 %	2557

Spez. Anamnese stumm; H: bds. Größe und Tonus an unterer Grenze der Norm; NH: o. B.; Pro.: derb; ganz vereinzelt Vorstufen;

232	19,9	18.3.35	4,0	7,6	104	70 %	87 %	2265

Seit 6 Jahren verheiratet, 1 Kind mit 6 Jahren; VK: -; Mumps: ?; H: re derb, Größe unt. d. Norm. li noch im Normbereich; NH, Pro. u. Samenstränge: o. B.;

233	16,35	26.4.32	4,0	7,5	151	60 %	85,5 %	3616

KW: seit 7 Jahren; VK: -; Mumps: - (?); H: noch im Normbereich; NH: o. B.; Samenstränge: o. B.; Pro.: weich; ganz vereinzelt Vorstufen;

234	30,0	20.1.37	3,5	7,5	30,4	70 %	75,5 %	3422

KW: seit 3 Jahren; VK: -; Mumps: als Kind, keine Orchitis; H: re etw. weich, li sehr weich, bds. Varicocelen; Pro.: o. B.; ganz vereinzelt Vorstufen;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
235	22,0	8.11.34	7,0	8,0	56,5	40 %	64,5 %	2880

H: bds. im Normbereich; Alc.: 4 Bier/die; Nic.: 20/die; vereinzelt Vorstufen;

236 16,05 6. 1.39 5,0 8,5 128 83 % 1964

KW: seit 3 Jahren; VK: -; Mumps: ?; H: bds. normalgroß, wenig tonisiert, Pubes horizont. begrenzt; Alc.: kaum; Nic.: 20/die; keine Vorstufen;

237 23,0 10.7.32 8,0 7,6 100 80 % 81 % 2210

KW: seit 4 Jahren; VK: -; Mumps: -; chron. Pancreatitis; H: bds. o. B.; NH: o. B.; Pro.: re Lappen druckschmerzhaft; Alc.: -; Nic.: -; vereinzelt Vorstufen;

238 22,8 23.1.33 5,0 7,9 194 80 % 78 % 2923

KW: seit 5 Jahren; VK: -; Mumps: -; Alc.: 2 Liter Most/die; Nic.: -; ganz vereinzelt Vorstufen;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
239	13,2	27.5.42	4,0	8,0	8,2		56,5 %	4464
Frau hatte 1962 eine Totgeburt, verließ ihn daraufhin; damals letzter Samenerguß; mehrere Vorstufen;								
240	16,8		4,0	8,3	19,2		65,5 %	1618
vereinzelt Vorstufen;								
241	22,9	5.10.28	2,5	7,5	196	70 %	84,5 %	2629
KW: seit 5 Jahren; ganz vereinzelt Vorstufen;								
242	14,5	23.7.32	5,0	8,0	65	80 %	90,5 %	3258
VK: -; Mumps: -; hatte mit der 1. Frau 2 Kinder; ganz vereinzelt Vorstufen;								
243	15,5	16.3.38	7,0	8,0	5,6		58,5 %	2701
VK: -; Mumps: -; H: o. B.; NH: o. B.; Nic.: 50 g/Wo; Alc.: kaum; einige Vorstufen;								

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
244	14,8		4,5	7,5	552		81 %	705
identisch mit Nr. 229; ganz vereinzelt Vorstufen;								
245	18,35	25.7.29	3,5	7,6	29	10 %	63,5 %	1568
KW: seit 10 Jahren; VK: -; Mumps: als Kind, ohne Orchitis; Pot. coeund.: o. B.; H: gut tonisiert, in Normb.; einige Vorstufen;								
246	20,55	25.12.37	8,0	7,7	38,5	50 %	68 %	4362
VK: -; Mumps: -; H und NH: o. B.; Nik.: 12/die; Alc.: -; einige Vorstufen;								
247	10,8	10.12.35	6,0	8,0	19,5	50 %	66 %	3915
mehrere Vorstufen;								
248	14,15	25.5.31	9,0	8,0	7,8	20 %	54,5 %	3307
KW: seit 8 Jahren; VK: -; Mumps: mit 13 Jahren, ohne Orchitis; H: nur li entwickelt; NH und Pro.: o. B.; einige Vorstufen;								

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
249	19,55	1.12.30	4,0	8,0	114	80 %	59,5 %	3653

15 Jahre verheiratet, 1 Sohn mit 10 Jahren; VK: -; Mumps: mit 8 Jahren; H: bs. in Normb., Tonus vermindert; NH: derb, indolent; Alc.: 1 Bier/die; Nic.: 12/die; vereinzelt Vorstufen;

250	30,3	4. 7.39	8,0	8,0	62,5	40 %	83 %	3272

KW: seit 4 Jahren; VK: -; Mumps: mit 8 Jahren; H: unter Normb., wenig tonisiert; NH: o. B.; Nic.: 10/die; Alc.: 6 Bier/die; ganz vereinzelt Vorstufen;

251	25,2	9.10.42	3,0	8,1	28,5	50 %	62 %	5480

Spez. Anamnese stumm; mehrere Vorstufen;

252	51,9	19.1.48	2,5	7,9	216	40 %	74,5 %	2150

Einige Vorstufen;

253	31,4	12.9.42	4,0	8,0	68	50 %	74 %	1464

KW: seit 2 Jahren; VK: -; Mumps: +, GO ?; Alc.: -; Nic.: -; mehrere Vorstufen;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
254	14,65	14.9.30	6,0	7,5	22	0 %	48 %	1769

KW: seit 7 Jahren; VK: -; Mumps: mit 9 Jahren; H: in Normb., gut tonisiert;
NH: druckempfindlich; ganz vereinzelt Vorstufen;

255	22,95	2.5.37	4,0	8,0	47	33 %	61,5 %	3938

KW: seit 4 Jahren; spez. Anamnese stumm; H: li Varicocele Tonus vermindert;
Vita sex.: o. B.; ganz vereinzelt Vorstufen;

256	18,15	18.12.33	8,0	8,0	8,3	50 %	54,5 %	4290

Spez. Anamnese stumm; H: li eichelgroß, weich, Varicocele; re zwetschgengroß, gut tonisiert;
NH: re druckschmerzhaft; einzelne Vorstufen;

257	14,8	12.8.37	6,0	7,6	228,5		81 %	498

KW: seit 1,5 Jahren; VK: -; Mumps: -; H: bds. o. B.; NH: o. B.; Nic.: -;
Alc.: 4 Bier/die; vereinzelt Vorstufen; Frau hatte vor 1 Jahr Abort;

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mil/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
258	19,1	7.3.38	10,0	7,7	0,2		53 %	3615
keine Vorstufen;								
259	17,65	15.12.28	8,0	8,0	50		75 %	4171
KW: seit 1,5 Jahren; H: gut tonisiert; NH: o. B.; Alc.: -; Nic.: -; mehrere Vorstufen;								
260	13,45	20.10.40	6,0	7,6	40		79 %	2652
einzelne Vorstufen;								
261	11,05	15.3.38	7,0	7,6	43,2		81,5 %	2869
vereinzelt Vorstufen;								

NrE	BKE (ng/ml)	GD	ME (ml)	pH	SA (Mill/ml)	Np (koordinierte Beweglichkeit)	Sg (normal geformt)	IF (µg/ml)
262	23,85	4.2.44	4,5	7,6	12		74,0 %	2898

KW: seit 4 Jahren; VK: -; Mumps: -; H: gut tonisiert, li kleiner als re, li Varicocele.

263	13,45		5,0	7,6	239	60 %		

(identisch mit Nr. 229 und 244)

264	14,8	29.5.35	7,0	7,8	115,5	80 %	83 %	2695

KW: seit 7 Jahren; VK: -; Mumps: -; H: gut tonisiert, li Varicocele; Pat. ist adipös; Frau hatte 1964 2 Aborte; ganz vereinzelt Vorstufen.

(graphische Darstellung der einzelnen klinischen Daten in Abhängigkeit zu den Bindungswerten siehe Anhang Tabellen VIII - XIV)

Abschließend wurde untersucht, ob eine Abhängigkeit zwischen der Vitamin B_{12}-Bindungskapazität des Serums und der des Ejakulates besteht. Von drei klinisch gesunden Spendern wurden kurz nach der Abgabe des Ejakulates je ca. 5 ml Blut entnommen. Je 0,5 ml Serum beziehungsweise Ejakulat wurden mit je 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung (50 ng ^{57}Co Vitamin B_{12}) beschickt, eine Stunde bei 37 °C inkubiert, mit 0,9 proz. NaCl-Lösung auf 10 ml aufgefüllt und in Dialysierschläuche eingefüllt. Alle Ansätze wurden bei 4 °C 96 Stunden lang gegen zwei Liter Außenflüssigkeit (0,9 proz. NaCl + 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung) dialysiert.

Die Abkürzungen in dieser Tabelle wurden zum Teil der vorhergehenden Tabelle entnommen. Die Spender wurden mit A, B und C bezeichnet. BKS und BKE stehen für Bindungskapazität des Serums und Bindungskapazität des Ejakulates.

Nach sechs Wochen wurde der Versuch mit Serum-bzw. Ejakulatansätzen der selben Spender wiederholt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard 57.200 I.p.m. Nulleffekt 70 I.p.m.

Spender	Alter	ME	pH	SA	Sg	Np	IF	BKS	BKE
A	25	6 ml	8,0	87 Mio	81 %	80 %	2288	3,9 ng/ml	8,2 ng/ml
								4,2 ng/ml	8,7 ng/ml
B	25	5 ml	7,6	67 Mio	85 %	30 %	3376	4,3 ng/ml	12,7 ng/ml
								5,0 ng/ml	13,2 ng/ml
C	26	5 ml	8,0	118 Mio	78 %	50 %	3406	3,4 ng/ml	20,5 ng/ml
								3,6 ng/ml	19,2 ng/ml
A	25	5 ml	8,2	72 Mio	81 %	25 %	2768	4,4 ng/ml	6,3 ng/ml
								4,7 ng/ml	6,8 ng/ml
B	25	6 ml	7,6	87 Mio	85 %	50 %	3467	4,8 ng/ml	13,3 ng/ml
								4,4 ng/ml	13,4 ng/ml
C	26	9 ml	8,0	42 Mio	78 %	40 %	3442	4,6 ng/ml	10,4 ng/ml
								4,4 ng/ml	10,9 ng/ml

Der Versuch zeigte, daß keine Beziehung zwischen der Serum Vitamin B_{12}-Bindungskapazität und der Vitamin B_{12}-Bindungskapazität des Ejakulates bestand.

M. Orientierender Versuch mit Hydroxocobalamin.

Es wurden Ansätze von Humanejakulat, von mit A.S. gefälltem Ejakulat, von Humanseren und von 1,6 proz. Gamma-Globulin-Lösung mit ^{57}Co Cyanocobalamin (= Co B_{12}) und mit ^{57}Co Hydroxocobalamin (= OH B_{12}) versetzt. Es sollte untersucht werden, ob hinsichtlich der Vitamin B_{12}-Bindungskapazität ein Unterschied zwischen den beiden Versuchsreihen auftritt. Alle Ansätze wurden eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert und anschließend 96 Stunden lang bei 4 °C gegen zwei Liter Außenflüssigkeit (0,9 proz. NaCl + 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung) dialysiert. Die Außenflüssigkeit wurde täglich gewechselt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Standard Co B_{12} 67.300 I.p.m.		Standard OH B_{12} 73.000 I.p.m.	
Nulleffekt 24 I.p.m.		Nulleffekt 32 I.p.m.	
alle Ansätze mit je 50 ng Co B_{12}/0,5 ml Proteinlösung		alle Ansätze mit je 50 ng OH B_{12}/0,5 ml Proteinlösung	
G_1	2,1 ng/ml	G_1	6,2 ng/ml
G_2	1,7 ng/ml	G_2	5,7 ng/ml
G_3	1,8 ng/ml	G_3	6,4 ng/ml
		G_4	4,7 ng/ml

S_1		7,9 ng/ml	S_1		17,6 ng/ml
S_2		7,7 ng/ml	S_2		18,9 ng/ml
S_3		6,8 ng/ml	S_3		17,3 ng/ml
S_4		7,0 ng/ml	S_4		17,8 ng/ml
152	A.S.	16,3 ng/ml	152	A.S.	21,7 ng/ml
152	A	21,0 ng/ml	152	A	34,8 ng/ml
152	B	19,8 ng/ml	152	B	33,9 ng/ml
152	C	19,2 ng/ml	152	C	33,8 ng/ml
153	A.S.	4,5 ng/ml	153	A.S.	8,2 ng/ml
153	A	11,6 ng/ml	153	A	24,8 ng/ml
153	B	11,5 ng/ml	153	B	23,7 ng/ml
153	C	10,5 ng/ml	153	C	25,0 ng/ml
156	A.S.	6,1 ng/ml	156	A.S.	11,3 ng/ml
156	A	7,0 ng/ml	156	A	18,4 ng/ml
156	B	6,4 ng/ml	156	B	19,6 ng/ml
156	C	7,4 ng/ml	156	C	19,4 ng/ml

Aus dem Versuch geht hervor, daß ^{57}Co Hydroxocobalamin von allen angesetzten Proteinlösungen stärker gebunden wird als das ^{57}Co Cyanocobalamin.

3.) Chromatographie-Versuche mit DEAE Sephadex-Gel A 50.

Alle Ansätze des Ejakulates "Nr. 162" waren mit je 0,5 ml Vitamin B_{12}-Stammlösung zu 50 ng ^{57}Co B_{12} versetzt worden. Nach 96 Stunden Dialyse gegen zwei Liter Außenflüssigkeit (0,9 proz. NaCl + 0,01 proz. Cialit®-Lösung) wurden alle Dialysate in einem Lyophilisierkolben gesammelt und lyophilisiert. Es ergaben sich 78 mg Trockensubstanz mit einer Radioaktivität von 24.800 I.p.m.

Gläschenvorversuch (sogenanntes "batch"-Verfahren):

Von der Trockensubstanz "Nr. 162" wurde eine Flocke (ca. 1,2 mg) in ein Reagenzglas gegeben und deren Radioaktivität bestimmt: 442 I.p.m. Die Flocke wurde in 1 ml Trispuffer (12,1 g Trispuffersubstanz in 500 ml Aqua dest. lösen + 80 ml 1-n HCl + Aqua dest. ad 2 000 ml) gelöst und die Radioaktivität bestimmt: 431 I.p.m. bei einem Nulleffekt von 25 I.p.m.

In der Proteinlösung wurden 3 ml DEAE Sephadex-Gel A 50 + 2 ml Trispuffer zugesetzt, vermischt, zentrifugiert und der Überstand aufgefangen. Die Radioaktivität von Sediment und Überstand wurde bestimmt (1. Waschung mit Trispufferlösung).

Nulleffekt 25 I.p.m.	Brutto-Impulszahl im Sediment	Brutto-Impulszahl im Überstand
1. W. m. T.*	355 I.p.m.	54 I.p.m.
2. W. m. T.*	346 I.p.m.	27 I.p.m.
3. W. m. T.*	342 I.p.m.	35 I.p.m.
4. W. m. T.*	344 I.p.m.	22 I.p.m.

*(W. m. T. = Waschung mit Trispufferlösung)

Anstatt Trispufferlösung wurden bei den folgenden Waschungen je 2 ml 0,3 proz. NaCl-Lösung zugesetzt. Es war zu erwarten, daß durch die ansteigende Ionenstärke im Gel Glykoprotein-Moleküle aus ihrer Bindung mit dem Austauschergel verdrängt werden.

1. W. m. 0,3 proz. NaCl-L.*	323 I.p.m.	51 I.p.m.
2. W. m. 0,3 proz. NaCl-L.*	289 I.p.m.	67 I.p.m.
3. W. m. 0,3 proz. NaCl-L.*	266 I.p.m.	50 I.p.m.
4. W. m. 0,3 proz. NaCl-L.*	231 I.p.m.	47 I.p.m.
5. W. m. 0,3 proz. NaCl-L.*	193 I.p.m.	39 I.p.m.

*(W. m. 0,3 proz. NaCl-L. = Waschung mit 0,3 proz. NaCl-Lösung)

Anstatt einer 0,3 proz. NaCl-Lösung wurden jetzt je 2 ml einer 2,0 proz. NaCl-Lösung zugesetzt:

1. W. m. 2,0 proz. NaCl-L.*	121 I.p.m.	123 I.p.m.
2. W. m. 2,0 proz. NaCl-L.*	71 I.p.m.	59 I.p.m.

*(W. m. 2,0 proz. NaCl-L. = Waschung mit 2,0 proz. NaCl-Lösung)

Nach diesem Vorversuch konnte man annehmen, daß man das ^{57}Co Vitamin B_{12}-bindende Glykoprotein durch ansteigende Ionenstärke im Austauscher-Gel aus seiner Bindung mit dem Austauscher-Gel lösen konnte.

Für den Hauptversuch wurden 20,5 mg der Trockensubstanz des Ejakulates "Nr. 162" in 3,0 ml Trispufferlösung gelöst. Mit dieser Lösung wurde eine entsprechend präparierte Austauschersäule (siehe Methode) beschickt, die 10 ml DEAE-Sephadex-Gel A-50 enthielt.

Als Spülflüssigkeiten dienten 1. Trispufferlösung und
2. 2,0 proz. NaCl-Lösung
(in Trispuffer gelöst)

Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug ca. 20 Tropfen/min, so daß die gesamte Spülflüssigkeit (je 100 ml) nach ca. vier Stunden durchgelaufen war. Es wurde mit einem 5-ml-Siphon fraktioniert. Bei den ersten acht 5 ml-Portionen diente als Spülflüssigkeit reine Trispufferlösung ohne NaCl-Zusatz, um zu sehen, ob eventuell nichtgebundenes B_{12} ausgeschwemmt wird. Danach wurde der NaCl-Lösung-Zulauf geöffnet, so daß mit einem Gemisch von Trispufferlösung und NaCl-Lösung in steigender Konzentration durchspült wurde. Nach Durchlauf der Spülflüssigkeit wurde die Radioaktivität in den einzelnen Gläschen bestimmt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Nulleffekt 23 I.p.m.

Gläschen-nummer	Impulszahl/ min	Gläschen-nummer	Impulszahl/ min
1	4	22	392
2	0	23	239
3	0	24	124
4	25	25	110
5	74	26	63
6	95	27	44
7	59	28	37
8	49	29	40
9	32	30	33
10	43	31	22
11	19	32	33
12	8	33	8
13	3	34	11
14	35	35	37
15	89	36	24
16	157	37	22
17	257	38	17
18	375	39	30
19	503	40	11
20	558	41	15
21	484		

(graphische Darstellung des Versuches siehe Anhang Tabelle XV)

Das in der Säule verbliebene Gel wurde suspendiert und die Radioaktivität gemessen. In 14 ml Gelsuspension befand sich noch eine Restradioaktivität von 80 I.p.m.

Das meiste ^{57}Co Vitamin B_{12} wurde also bei einer NaCl-Konzentration von 0,75 % der Spülflüssigkeit ausgewaschen.

Die Inhalte der Gläser "Nr. 1 bis 12" und der Gläser "Nr. 18 bis 22" wurden jeweils vereinigt, 24 Stunden gegen 0,01 proz. Cialit(R)-Lösung dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden eingefroren und für später durchgeführte Immunelektrophoresen aufgehoben.

4. Immunelektrophoresen

Die Immunelektrophoresen wurden nach der beschriebenen Methode durchgeführt. Bei den ersten drei Ansätzen wurde Special Agar Noble (Difco, Detroit) verwendet.

1. Ansatz: Antigen I : Humanserum (HS)
Antigen II: Humanejakulat (HE)
Antikörper: Antihumanserum (AHS)

Humanejakulate ergaben mit Antihumanserum vier Präzipitationssicheln, wovon drei Komponenten anodenwärts, eine kathodenwärts liefen. (Vgl. LICHT u. KEUTEL; SEARCY u. CRAIG).

(S. Abbildung I Seite 87)

2. Ansatz: Antigen I : Humanserum (HS)
Antigen II: Humanejakulat (HE)
Antikörper: Antihumanejakulat (AHE)
(Kaninchen)

Humanserum bildete mit Antihumanejakulat keine Präzipitationssicheln.
(Vgl. SEARCY u. CRAIG).

(S. Abbildung II Seite 87)

3. Ansatz: Antigen I : Humanejakulat (HE) (kleine Auftragstelle)
Antigen II: Humanejakulat (HE) (große Auftragstelle)
Antikörper: Antihumanejakulat (AHE) (Kaninchen)

Im Pherogramm sind acht Präzipitationssicheln erkennbar. (Vgl. LICHT u. KEUTEL).

(S. Abbildung III Seite 87)

Für die folgenden Ansätze wurde Reinagar der Behringwerke verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung war jedoch infolge zu kurzer Wanderstrecken nicht vollkommen.

4. Ansatz: Antigen I : Lyophilisat vom Vorlauf (Glas 1 bis 12) des Ejakulates "162" (3,1 mg wurden in 100 µl gelöst) aus Versuch IV/3
Antigen II: Humanejakulat (HE)
Antikörper: Antihumanejakulat (AHE) (Kaninchen)

Es sind drei Präzipitationssicheln erkennbar.

(S. Abbildung IV Seite 87)

5. Ansatz: Antigen I : Lyophilisat von Glas 18 bis 22 des Ejakulates "Nr. 162" (3,1 mg wurden in 100 µl gelöst) aus Versuch IV/3
Antigen II: Humanejakulat (HE)
Antikörper: Antihumanejakulat (AHE) (Kaninchen)

Es sind drei Präzipitationssicheln zu erkennen. Im Vergleich zum Ansatz 4 sind deutliche Unterschiede aufgetreten.

(S. Abbildung V Seite 87)

6. Ansatz: Antigen I : Lyophilisat des Dialysates vom Sediment des Ejakulates "Nr. 160, Schritt Bb" aus Versuch 1 Jc (10,7 mg wurden in 250 µl gelöst, 1363 I.p.m.), s. Seite 33
Antigen II: Lyophilisat des Dialysates vom Sediment des Ejakulates "Nr. 160, Schritt Fc" aus Versuch 1 Jc (13,8 mg wurden in 350 µl gelöst, 3311 I.p.m.), s. Seite 33
Antikörper: Antihumanejakulat (AHE) (Kaninchen)

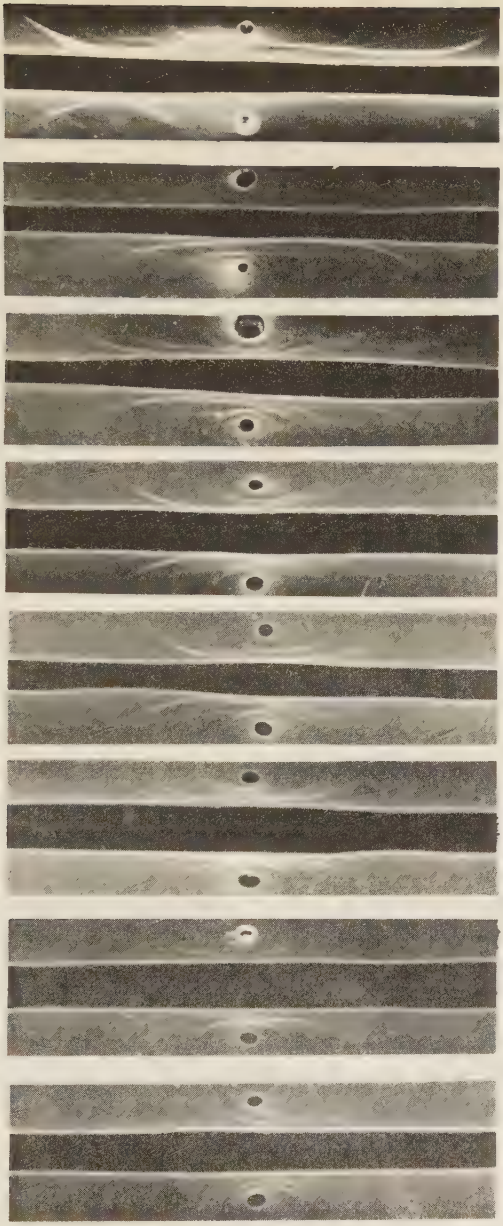
(S. Abbildung VI Seite 87)

7. Ansatz: Antigen I : Lyophilisat des Dialysates vom Sediment des Ejakulates "Nr. 160, Schritt Dc" aus Versuch 1 Jc (15,2 mg wurden in 400 µl gelöst, 4711 I.p.m.), s. Seite 33
Antigen II: wie Antigen II aus Ansatz 6
Antikörper: Antihumanejakulat (AHE) (Kaninchen)

(S. Abbildung VII Seite 87)

8. Ansatz: Antigen I : Lyophilisat des Dialysates vom Überstand des Ejakulates "Nr. 160, Schritt C" aus Versuch 1 Jc (3,5 mg wurden in 100 µl gelöst, 3433 I.p.m.), s. Seite 33
Antigen II: Lyophilisat des Dialysates vom Überstand des Ejakulates "Nr. 160, Schritt Fb" aus Versuch 1 Jc (2,9 mg wurden in 100 µl gelöst, 268 I.p.m.), s. Seite 33
Antikörper: Antihumanejakulat (AHE) (Kaninchen)

(S. Abbildung VIII Seite 87)


I
+
-
II
+
-
III
+
-
IV
+
-
V
+
-
VI
+
-
VII
+
-
VIII
+
-

5. Autoradiographien

Die Objektträger der acht Ansätze, die der Immuneletrophorese unterworfen wurden, wurden auf Röntgenfilm aufgeklebt und in Röntgenkassetten vier Monate lang der Selbstbelichtung überlassen. Eine Schwärzung des Filmes trat jedoch nicht ein, da nicht mit ^{60}Co Vitamin B_{12}, sondern mit ^{57}Co Vitamin B_{12} beschickt worden war.

V. Diskussion

Alle Substanzen, die in vivo Vitamin B_{12} binden, scheinen Glykoproteine zu sein (SIMONS, 1964). Auch im menschlichen Seminalplasma kommen Glykoproteine vor (LICHT u. KEUTEL, 1963; HERRMANN, 1966 und SCHNEIDER, 1954). Nach VRUBLOVSKY et. al. (1966) soll der Gehalt an gebundenen Hexosen im menschlichen Seminalplasma zwei- bis dreimal höher sein als der im Blut. Es konnte jedoch nicht entschieden werden, ob der Glykoproteingehalt im Seminalplasma besonders hoch ist, oder ob die Glykoproteine einen höheren Gehalt an Hexosen aufweisen.

Die Vitamin B_{12}-bindende Hauptkomponente kommt wahrscheinlich im Vergleich zu den begleitenden Glykoproteinen nur in geringen Mengen vor (KALLEE et. al., 1964; SIMONS, 1964). Immunelektrophoretisch konnte sie bisher nicht als Nativsichel dargestellt werden, wohl aber in Form von Autoradiographien (SIMONS, 1964; KARYPIDIS, 1966).

Mit Hilfe der fraktionierten Fällung von Proteinlösungen mit Ammoniumsulfat bei bestimmtem pH unter Verwendung von markiertem Vitamin B_{12} als Indikator konnten WEIMER et. al., (1950) und KALLEE et. al. (1964) eine gute Einengung der Vitamin B_{12}-bindenden Glykoproteine erreichen. Nach eigenen Untersuchungen scheint jedoch die Ammoniumsulfat-Fällungsmethode, wie sie von KARYPIDIS (1966) ausgearbeitet wurde, zur Bestimmung der Vitamin-B_{12}-Bindungskapazität der Samenflüssigkeit nicht geeignet zu sein. Versetzt man z. B. eine 1,6 proz. Gamma-Globulin-Lösung mit 100 ng ^{57}Co-Vitamin B_{12}/ml und fällt nachfolgend mit Ammoniumsulfat-Lösung, so liegen die

Vitamin B_{12}-Bindungswerte bei 80 ng/ml. Außerdem läßt sich nahezu die gesamte Radioaktivität aus dem Proteinsediment herauslaugen, wenn man das Sediment oft genug in Wasser aufnimmt und mit Ammoniumsulfat-Lösung wieder fällt. Auffallend war auch, daß der Auslaugeeffekt bei verschiedenen Ejakulaten unterschiedlich groß war.

Die Ergebnisse der Vitamin B_{12}-Bindung hängen bei der Dialysiermethode wesentlich von den äußeren Bedingungen ab. Die von BEAL (1964) gefundenen Abhängigkeiten hinsichtlich Konzentration des zugesetzten ^{57}Co-Vitamin-B_{12}, der Dauer der Inkubation, der Dauer der Dialyse und der Art der Außenflüssigkeit konnten bestätigt werden. Zudem beeinflussen folgende Versuchsbedingungen die Dialyseergebnisse ganz erheblich:

a. Höhe der Temperaturen während der Inkubation und während der Dialyse.

b. Die spezifische Radioaktivität der ^{57}Co-Vitamin-B_{12} Stammlösung.

c. Fällung der Proteinlösung mit Ammoniumsulfat vor Zusatz der radioaktiven Vitamin B_{12}-Stammlösung.

Wenn die Proteinlösungen vor der Dialyse zuerst mit radioaktivem Vitamin B_{12} versetzt und dann erst mit Ammoniumsulfat gefällt werden, enthalten sie wahrscheinlich erhebliche Mengen an Ammoniumsulfat. Daher dürfte es während der Dialyse zu einem osmotischen Wassereinstrom in den Dialysierschlauch kommen, wodurch die Proteinlösungen verdünnt werden. Ob die

Vitamin B_{12}-Bindungskapazität der mit A.S. gefällten Proteinlösungen allein auf Grund des Verdünnungseffektes signifikant niedriger war als die Bindungskapazität der nativen Proteinlösungen, muß dahingestellt bleiben. Nach GOTTSCHALK (1966) könnte es sich hier auch um einen Denaturierungseffekt handeln. Zudem wird das Vitamin B_{12} bei fallenden pH-Werten ab pH 4,5 in zunehmendem Maße dialysierbar (SIMONS, 1964). Deshalb ist die Neutralisierung eines Dialyseansatzes nach vorausgegangener Fällung mit A.S.-Lösung pH 3,5 unerläßlich.

Nach SIMONS (1964) ist die Vitamin B_{12}-Bindung spezifisch und verhältnismäßig stark. Nach BERTCHER et. al. (1960) soll die Vitamin-B_{12}-Absättigung an den Bindungsplätzen der Glykoproteine in vitro nach Zusatz von Vitamin B_{12} innerhalb von 20 bis 40 sec eingetreten sein. Bei Temperaturen über 35 °C soll jedoch ein Austausch von gebundenem Vitamin B_{12} und freiem Vitamin B_{12} stattfinden (DONALDSON u. KATZ, 1963).

Ein Zusatz von $CoCl_2$-Lösung zum Dialysat oder Dialyse von Ejakulatansätzen gegen 0,9 proz. NaCl-Lösung bzw. 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung ergab keine sich signifikant unterscheidenden Werte. Ansätze, die mit einem Rührwerk dialysiert wurden, ergaben gegenüber Ansätzen, die gleichzeitig gegen stehendes Wasser dialysiert wurden, signifikant erniedrigte Werte.

Bei Vergleichsansätzen der selben Proteinlösungen, die mit Vitamin B_{12}-Stammlösungen von unterschiedlicher spezifischer Radioaktivität beschickt wurden, banden die Serumansätze anteilmäßig gleich viel

radioaktives ^{57}Co-Vitamin B_{12}, während die Ejakulatansätze mit niedrigerer spezifischer Radioaktivität in der Vitamin-B_{12}-Stammlösung auch niedrigere Bindungswerte aufwiesen. Die Transcobalamine des Serums schienen also die beiden Vitamin B_{12}-Substanzen verschiedenartig zu adsorbieren, während die Sperma-Glykoproteine offenbar ^{57}Co-Vitamin B_{12} und nichtradioaktives Vitamin B_{12} gleichartig banden.

Ansätze von Proteinlösungen, die mit ^{57}Co-Hydroxocobalamin beschickt wurden, ergaben durchwegs höhere Bindungswerte als Ansätze der selben Proteinlösungen, die mit ^{57}Co-Cyanocobalamin beschickt wurden.

Der Versuch mit der Sephadex-Gel-Austauschersäule hatte nur orientierenden Charakter. Immerhin war es möglich, mit einem Lauf eine Proteinfraktion zu gewinnen, die zwar immunologisch noch aus drei bis vier Komponenten bestand, jedoch eine hohe Vitamin B_{12}-Bindung aufwies. Eventuell wäre es möglich, durch Kombination verschiedener Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten die Vitamin B_{12}-bindenden Substanzen auf diesem chromatographischen Wege reiner darzustellen (SCHMIDT, 1962; BEAL, 1964 und SIMONS, 1964).

Das Ergebnis von Immunelektrophoresen ist unter anderem wesentlich abhängig vom optimalen Verhältnis von Antigen und Antikörper (LICHT u. KEUTEL, 1963). In eigenen Versuchen bildeten sich bei Diffusion von Humanejakulat gegen Antihumanejakulat vom Kaninchen acht bis neun Präzipitationssicheln. Bei Diffusion von Humanejakulat gegen Antihumanserum bildeten sich nur vier, bei Diffusion von Humanserum gegen Antihumanejakulat keine Präzipitationssicheln aus. Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (LICHT u. KEUTEL, 1963; SEARCY u. CRAIG, 1961).

Zusammenfassung

1. Es wurden Ejakulatansätze von 187 Probanden untersucht. Die Ansätze von 103 Probanden wurden lediglich mittels einer Ammoniumsulfat-Fällungsmethode untersucht, die Ansätze von 84 Probanden nach einer Dialysiermethode aufgearbeitet, davon die Ansätze von 54 Probanden nach standardisierten Bedingungen.

2. Die von KARYPIDIS (1966) erhaltenen Vitamin B_{12}-Bindungswerte von Humanejakulatansätzen, die nach einer von ihm entwickelten Ammoniumsulfat-Fällungsmethode aufgearbeitet waren, konnten reproduziert werden. Jedoch handelt es sich dabei nicht nur um eine spezifische Vitamin B_{12}-Bindung, sondern wahrscheinlich größtenteils um einen mechanischen Einschluß von Vitamin B_{12} in Proteinpräzipitate, aus denen sich das meiste Vitamin B_{12} auswaschen läßt. Auch mit einer 1,6 proz. Gamma-Globulinlösung ließen sich durch alleinige Fällung mit Ammoniumsulfat im Sediment Bindungswerte im Bereich von 80 ng/ml bei Zusatz von 100 ng ^{57}Co Vitamin B_{12}/ml Gamma-Globulin-Lösung feststellen.

3. Äußere Bedingungen beeinflussen die Vitamin B_{12}-Bindungskapazität entscheidend, wenn die Werte mittels Dialyse ermittelt werden. Um Bindungswerte vergleichen zu können, müssen deshalb bestimmte Bedingungen eingehalten werden:

a) Dauer von Inkubation und Dialyse

b) Temperatur während der Inkubation und der Dialyse

c) Konzentration der Vitamin B_{12}-Stammlösung

d) Spezifische Radioaktivität der Vitamin B_{12}-Stammlösung

e) Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat vor Zusatz von Vitamin B_{12}

f) pH der Proteinlösung

g) Zusammensetzung der Außenflüssigkeit (Salze, Konservierungsmittel)

4. Die durchschnittliche apparente Vitamin B_{12}-Bindungskapazität von menschlichen Ejakulaten betrug bei Zusätzen von 100 ng ^{57}Co-Vitamin B_{12}/ml Ejakulat nach erschöpfender Dialyse gegen 0,01 proz. Cialit$^{(R)}$-Lösung 19,7 ± 8,3 ng ^{57}Co B_{12}/ml Ejakulat. Unter gleichen Bedingungen betrug die Vitamin B_{12}-Bindungskapazität von Humanseren 8,4 ± 1,1 ng ^{57}Co B_{12}/ml Humanserum.

   Bei Dialyse gegen 0,9 proz. NaCl-Lösung anstelle von Cialit$^{(R)}$-Lösung betrug die apparente Vitamin B_{12}-Bindungskapazität der Ejakulate 20,1 ± 9,3 ng ^{57}Co B_{12}/ml Ejakulat, während die Bindungskapazität der Humanseren hierbei nur 3,5 ± 0,5 ng ^{57}Co B_{12}/ml Serum betrug.

5. Unter der willkürlichen Annahme, daß sich nichtradioaktives und radiomarkiertes Cyanocobalamin biochemisch gleich verhielten, wären bei einer zehnfach höheren Vitamin B_{12}-Konzentration in der zugesetzten Stammlösung die genannten Kapazitätswerte für die Ejakulate

etwa mit dem Faktor 3 zu multiplizieren. Dagegen scheinen Serumglykoproteine ^{57}Co-Vitamin B_{12} und handelsübliches Cytobion$^{(R)}$ verschiedenartig zu binden.

6. ^{57}Co-Hydroxocobalamin wurde in allen hier untersuchten Proteinlösungen etwa doppelt so stark an Proteine adsorbiert wie ^{57}Co-Cyanocobalamin.

7. Die Vitamin B_{12}-Bindungskapazität menschlicher Ejakulate erwies sich als unabhängig vom Alter der Probanden, von der Menge des Ejakulates, vom pH-Wert des Nativejakulates, von der Konzentration der Initialen Fructose, von der Zellzahl des Ejakulates, von der Anzahl der koordiniert beweglichen Spermien, von der Anzahl der normal geformten Spermien und vom Nikotinkonsum der Probanden.

A n h a n g

Abb. I - XV

Seite 98 - 112

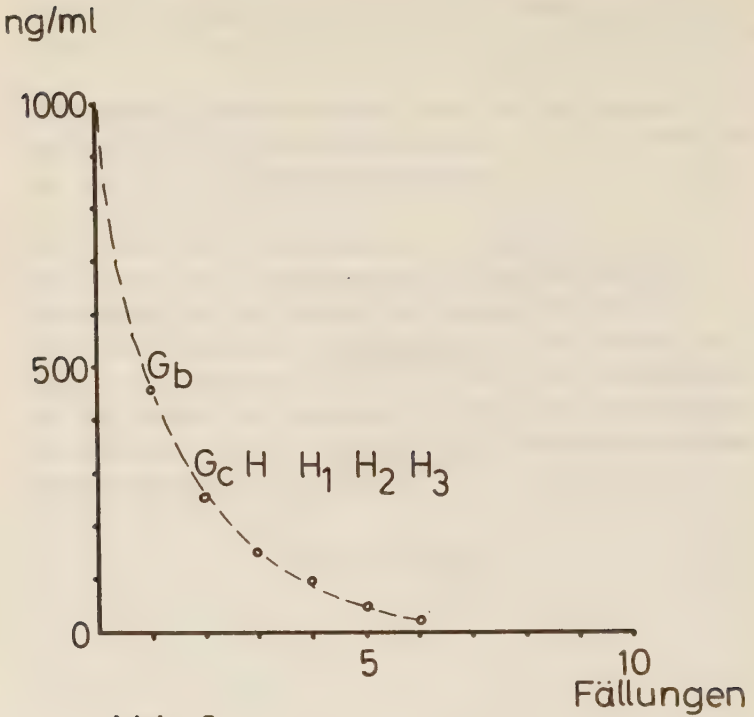


Abb. I

Vom Ejakulat Nr. 14 lagen vier Ansätze vor, die nach dem Schema I der Ammoniumsulfat-Fällungsmethode aufgearbeitet wurden. In Schritt "Ga" wurden jeweils 100 ng $^{57}CoB_{12}$ + 900 ng Cytobion$^{(R)}$ pro ml Ansatz zugefügt (= 1000 ng B_{12}/ml). Die Vitamin B_{12}-Bindungswerte wurden jedoch schon bei den Sedimenten aus Schritt "Gb", "Gc" und zur endgültigen Radioaktivitätsmessung beim Sediment aus Schritt "H" gemessen. Das Sediment aus Schritt "H" wurde noch dreimal in Wasser aufgenommen und danach jeweils wieder mit Ammoniumsulfat-Lösung gefällt, wobei die Bindungswerte gemessen wurden.

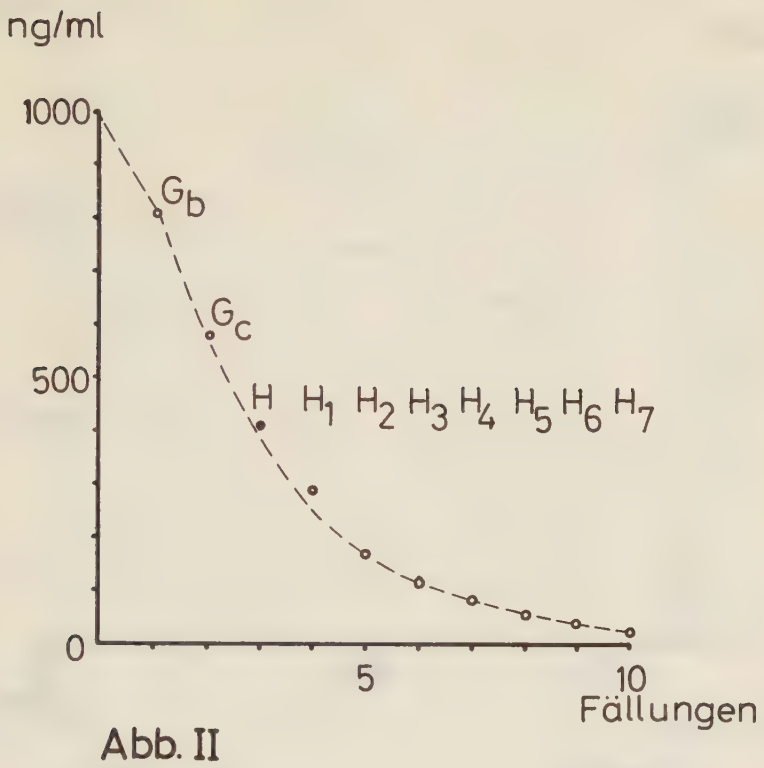


Abb. II

Entsprechend dem vorhergehenden Versuch wurden vier Ejakulate aufgearbeitet. Ein ml der zugesetzten Vitamin B_{12}-Lösung enthielt 100 ng $^{57}CoB_{12}$ + 900 ng Cytobion$^{(R)}$. Der Mittelwert aus den vier Bindungskapazitätswerten wurde in die Abbildung übernommen. (Seite 15)

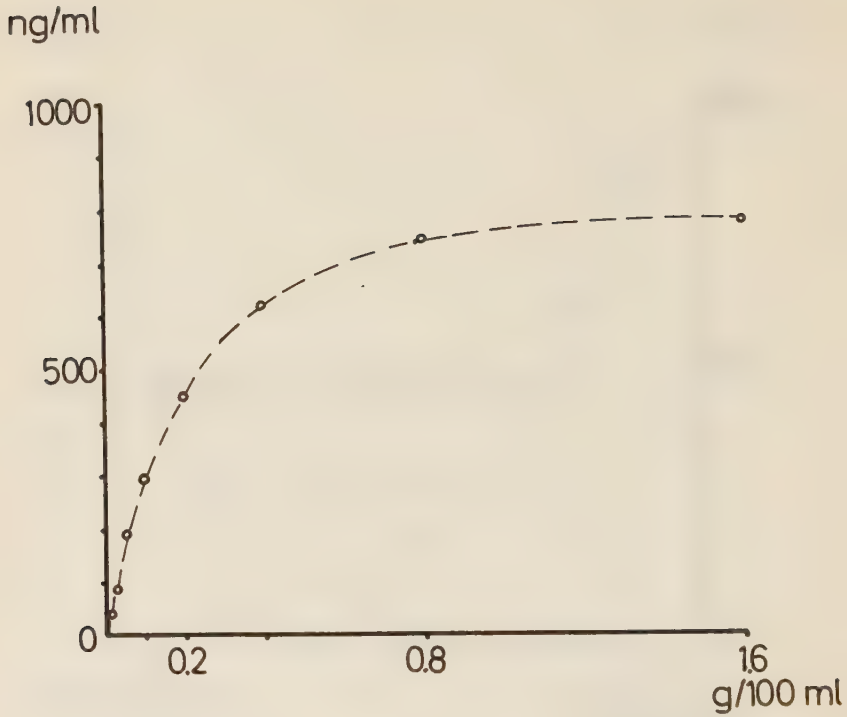


Abb. III

Eine 1,6proz. Gammaglobulin-Lösung wurde fortlaufend verdünnt, so daß 0,8 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 und 0,0125proz. Lösungen entstanden. Von jeder Konzentrationsstufe wurden jeweils drei Ansätze zu 0,5 ml mit jeweils 0,5 ml Vitamin B_{12}-Lösung (= 100 ng $^{57}CoB_{12}$ + 900 ng Cytobion$^{(R)}$/ml) versetzt und nachfolgend mit Ammoniumsulfatlösung gefällt. Der Mittelwert der Vitamin B_{12}-Bindungswerte der drei Ansätze einer jeden Konzentrationsstufe wurde umgerechnet auf den Zusatz von 1000ng $^{57}CoB_{12}$/ml Gammaglobulinlösung und in die Abbildung übernommen.(Streng genommen waren die Ansätze nach Zusatz von Vitamin B_{12}-Lösung dann 1:2 verdünnt)

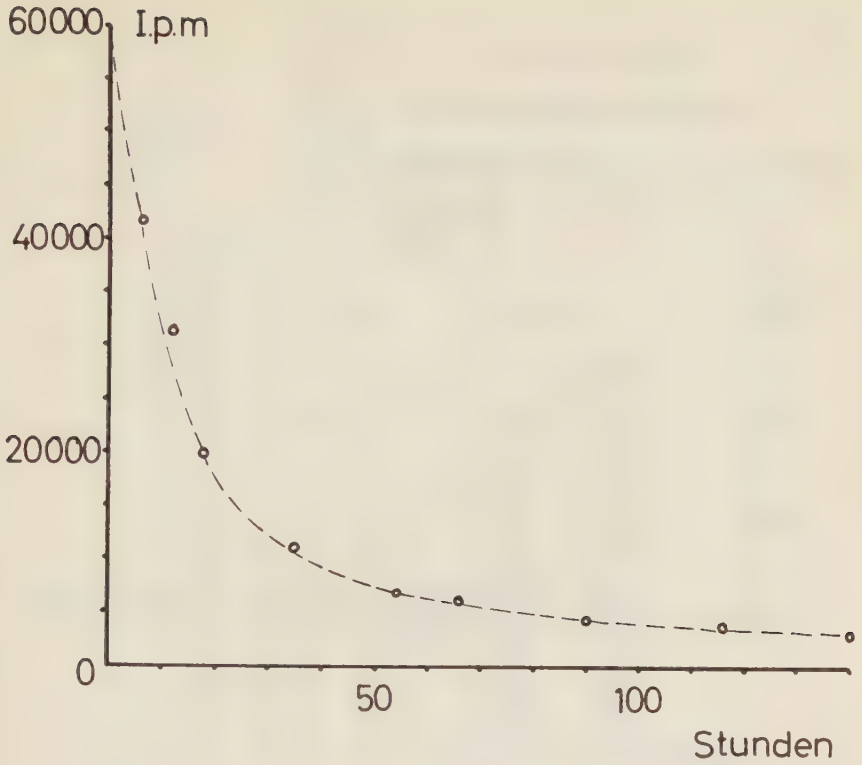


Abb. IV

16 Ansätze zu je 0,5 ml Humanserum wurden mit jeweils 0,5 ml Vitamin B_{12}-Lösung (100 ng $^{57}CoB_{12}$ + 900 ng Cytobion$^{(R)}$/ml) versetzt. Je ein Ansatz wurde in einem 250 ml-Meßzylinder gegen 100 ml einer 0,01 prozentigen Cialit$^{(R)}$-Lösung als Außenflüssigkeit dialysiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde von einem Ansatz die Radioaktivität in der Innenflüssigkeit bestimmt. Der letzte Wert gibt den Mittelwert aus den verbliebenen acht Ansätzen an.

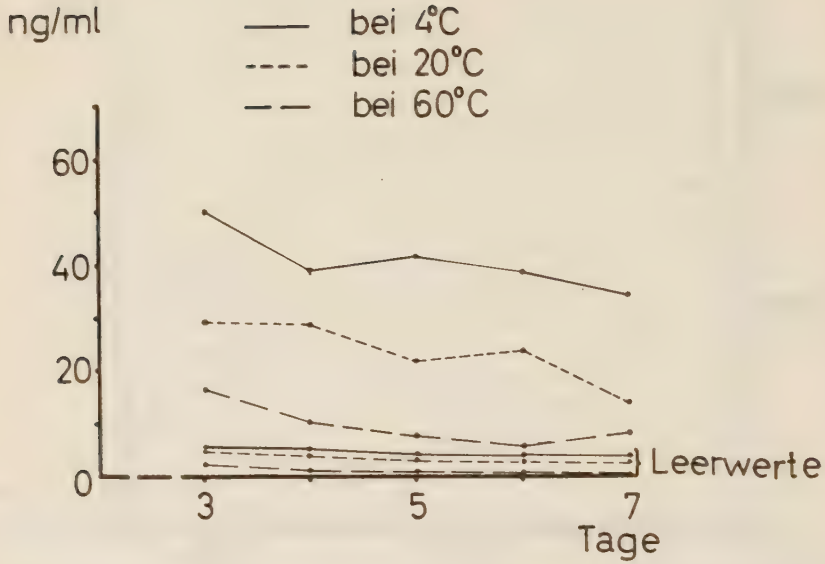


Abb. V

Es wurden 15 Leerwerte (je 0,5 ml einer Vitamin B_{12}-Lösung zu 100 ng $^{57}CoB_{12}$ + 900 ng Cytobion$^{(R)}$/ml in 4,5 ml Wasser) und 15 Serumansätze (je 0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Lösung in 4 ml Wasser) angesetzt. Je fünf Ansätze wurden in einer Flasche gegen zwei Liter 0,01 prozentige Cialit$^{(R)}$-Lösung dialysiert. Je eine Flasche mit fünf Leerwerten bzw. fünf Serumansätzen wurde bei 4°C, bei Zimmertemperatur und bei ca. 60°C dialysiert. Die Außenflüssigkeit wurde täglich gewechselt.

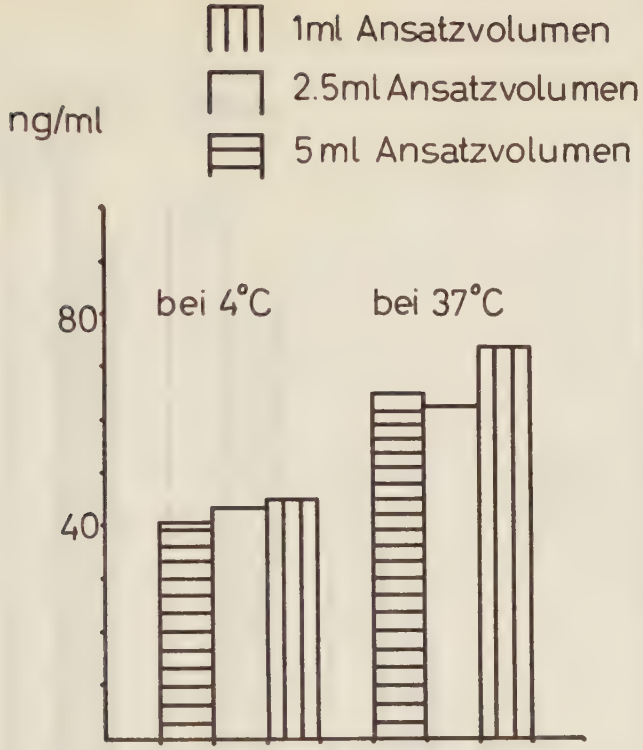


Abb. VI

Es wurden sechsmal je

0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Lösung
0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Lösung + 1,5 ml H_2O
0,5 ml Humanserum + 0,5 ml Vitamin B_{12}-Lösung + 4,0 ml H_2O

angesetzt. Ein ml Vitamin B_{12}-Lösung enthielt 100 ng $^{57}CoB_{12}$ + 900 ng Cytobion$^{(R)}$/ml.
Die Hälfte aller Ansätze wurde eine Stunde bei 4°C, die andere Hälfte eine Stunde bei 37°C inkubiert. Alle Ansätze wurden 96 Stunden bei 4°C dialysiert.

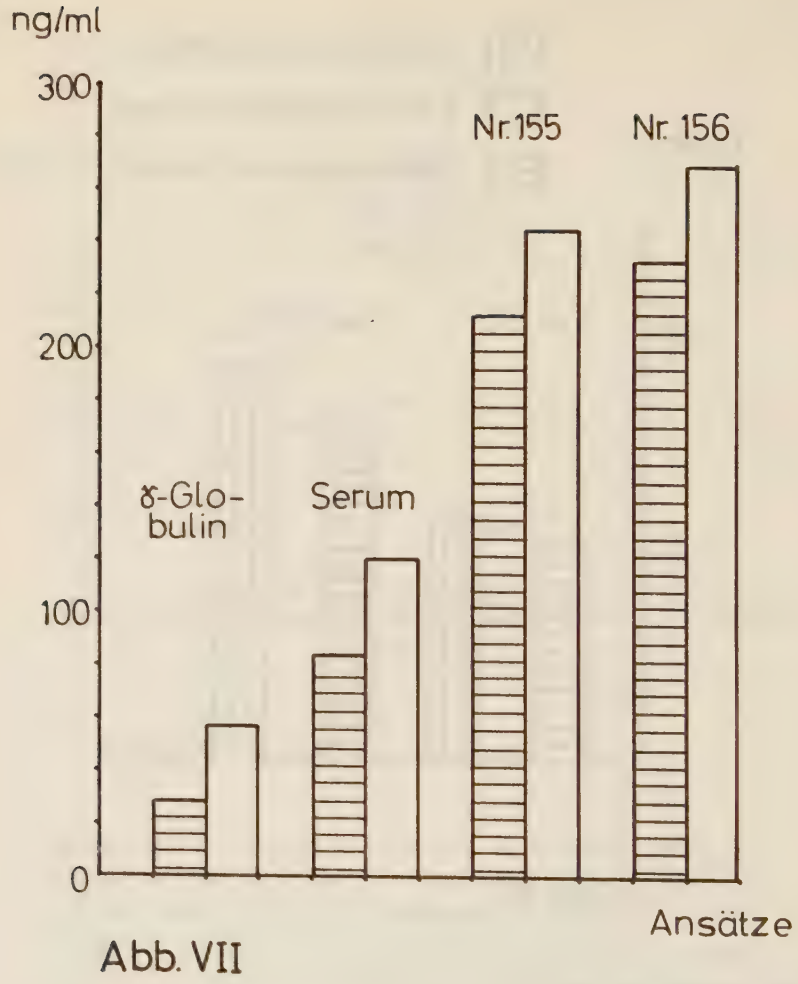


Abb. VII

Es lagen sechs 0,5 ml Portionen einer 1,6 prozentigen Gammaglobulinlösung, sechs 0,5 ml Portionen von Humanserum und je zwei 0,5 ml Portionen der Ejakulate Nr. 155 und 156 vor. Alle Ansätze wurden mit jeweils 0,5 ml einer Vitamin B_{12}-Lösung (100 ng $^{57}CoB_{12}$ + 900 ng Cytobion$^{(R)}$/ml) versetzt. Die Hälfte aller Ansätze wurde nach Zusatz der Vitamin B_{12}-Lösung sofort dialysiert, die andere Hälfte blieb nach Zusatz der Vitamin B_{12}-Lösung noch fünf Stunden bei Zimmertemperatur stehen und wurde erst dann dialysiert.

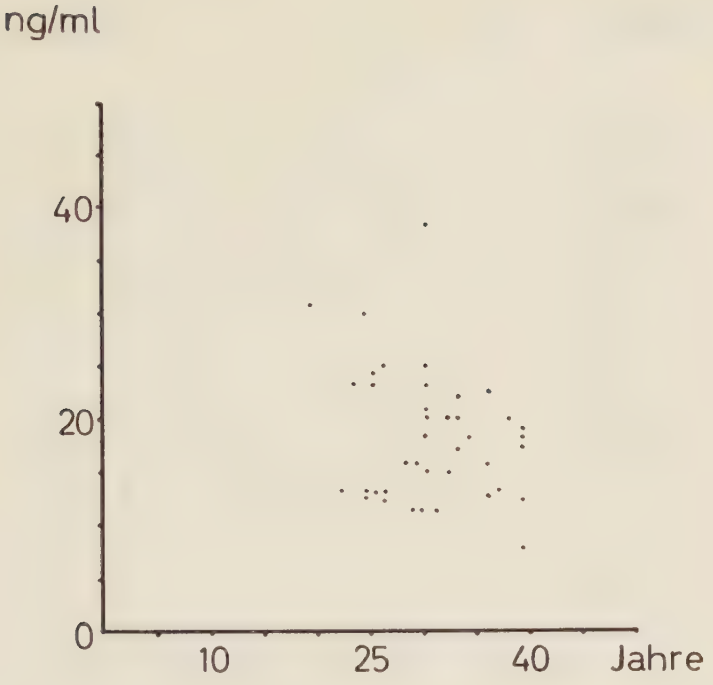


Abb. VIII

Einfluß des Alters des Patienten auf die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit des Ejakulates.

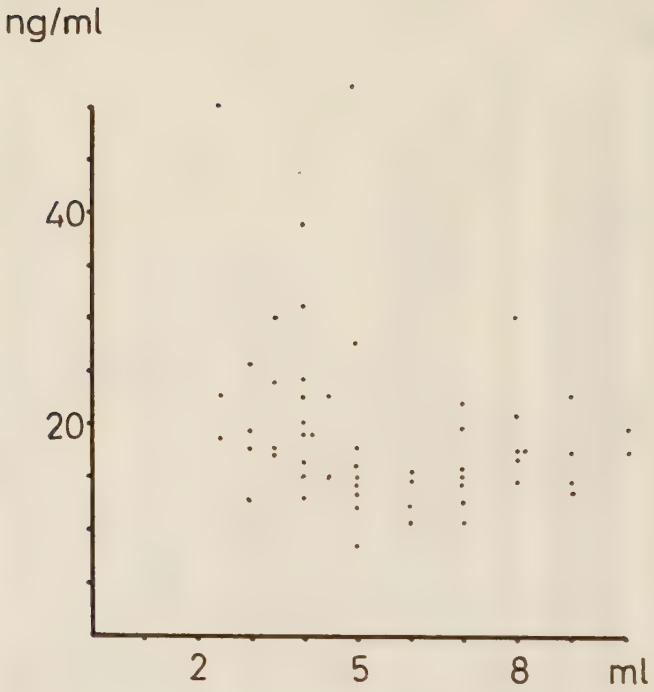


Abb. IX

Einfluß der Menge des Ejakulates auf die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit.

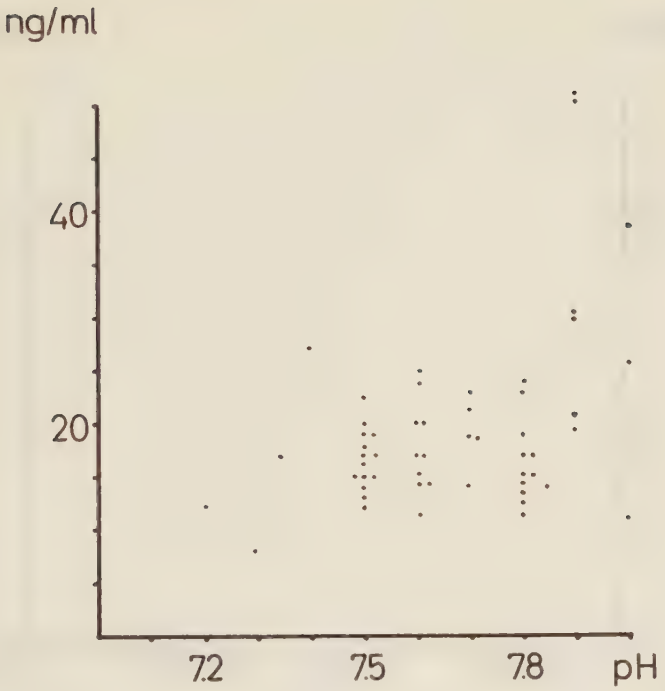


Abb. X

Einfluß des Nativ-pH des Ejakulates auf die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit.

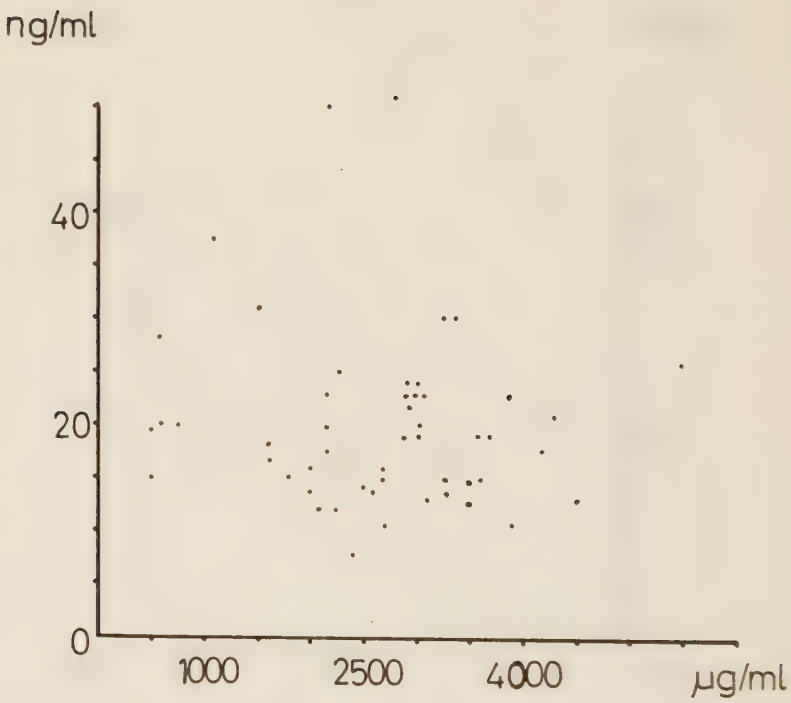


Abb. XI

Einfluß der Initialen Fructose auf die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit des Ejakulates.

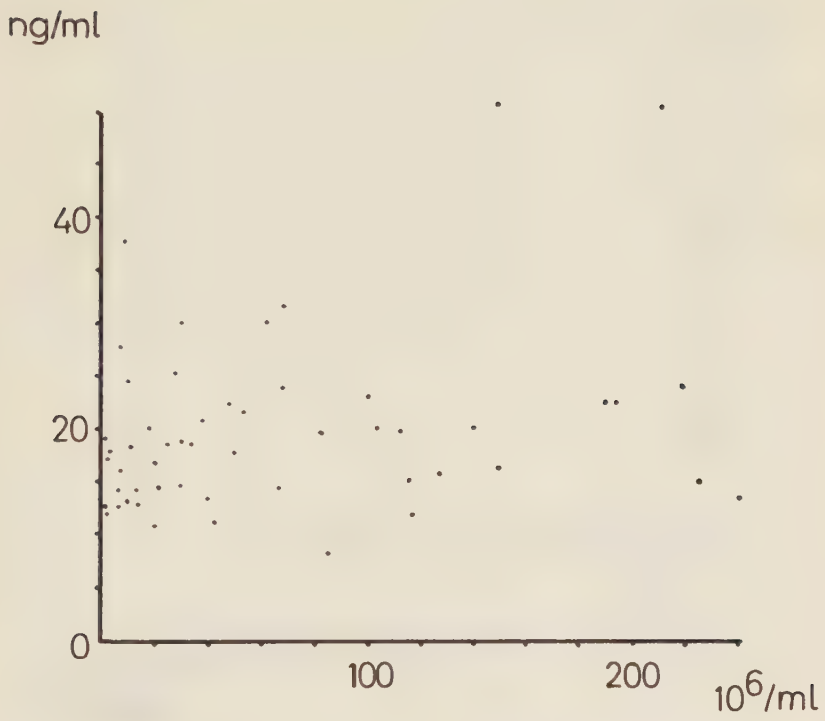


Abb. XII

Einfluß der Anzahl der Spermien auf die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit des Ejakulates.

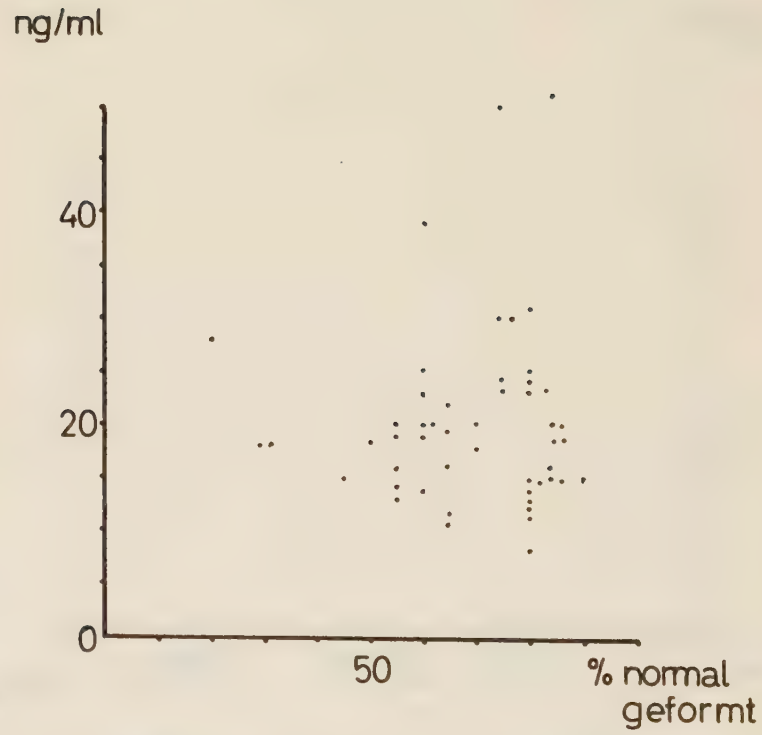


Abb. XIII

Einfluß der Form der Spermien auf die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit des Ejakulates.

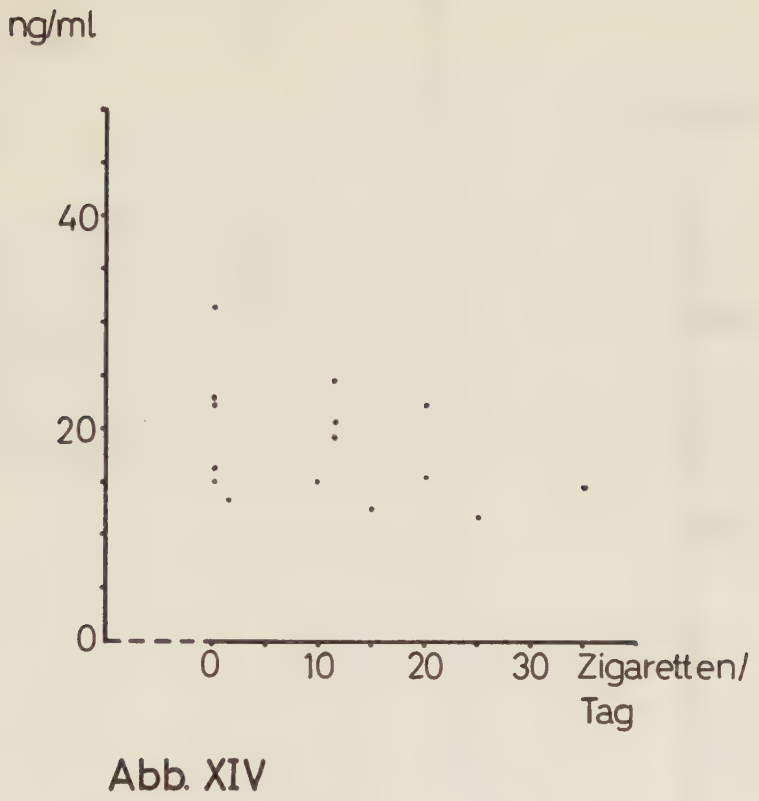


Abb. XIV

Einfluß des Nikotinkonsums auf die Vitamin B_{12}-Bindungsfähigkeit des Ejakulates.

Zu Abb. XV Sephadex-Gel Versuch

20,5 mg der lyophilisierten Trockensubstanz des Ejakulates Nr. 162 wurden in 3,0 ml Trispufferlösung aufgenommen. Damit wurde eine präparierte Austauschersäule beschickt, die 10 ml DEAE-Sephadex-Gel A 50 enthielt. Als Spülflüssigkeiten dienten Trispufferlösung und 2,0 prozentige NaCl-Lösung. Der Zulauf der NaCl-Lösung wurde ab Glas Nr. 7 geöffnet.(↓)

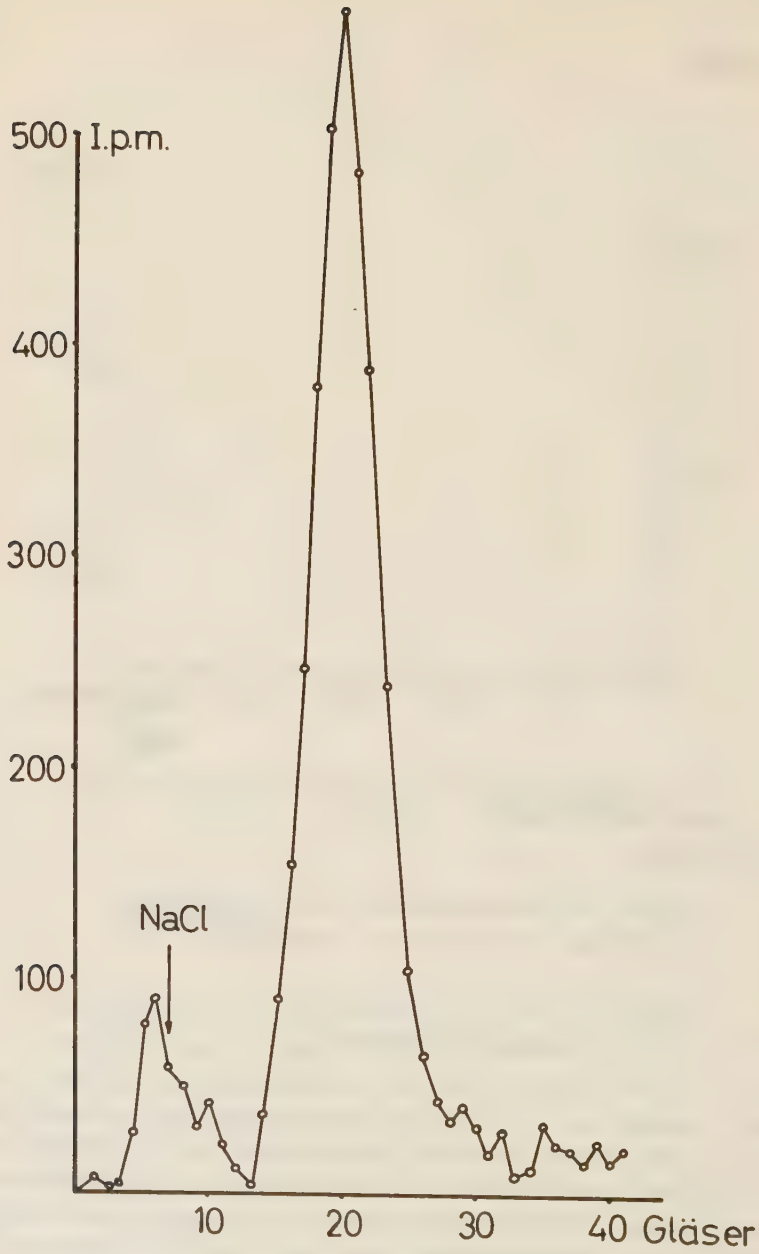


Abb. XV

Herrn Prof. Dr. E. KALLEE danke ich für das Thema und für die Anleitung zu dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. W. ADAM (Universitätshautklinik, Tübingen) für Überlassung der Ejakulate und der Spermiogramme und Dr. W. L. CASTRILLON-OBERNDORFER für viele Literaturhinweise. Die Herren Drs. K. HEIDE und H. G. SCHWICK (Behring-Werke A. G., Marburg/Lahn) stellten freundlicherweise die Anti-Humanspermaplasma-Antiseren (vom Kaninchen) zur Verfügung.

Literatur

ADAM W. u. G. W. KORTING - Die freien Aminosäuren im menschlichen Seminalplasma und ihre klinische Bedeutung. - Deutsch. Med. Wschr. 80 : 249 , 1955

ALEXANDER W. F. - Pathomorphology of the nervous system. in "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor" 1. Europäisches Symposion Hamburg 1956 (Hrsg.: H. C. HEINRICH) S. 372 , Enke , Stuttgart 1957

ALLCOCK E. - Absorption of vitamin B_{12} in man following extensive resection of the jejunum, ileum and colon. Gastroenterology 40 : 81 , 1961

ANDERSON B. B. - Investigations into the euglena method for the assay of the vitamin B_{12} in serum. - J. Clin. Path. 17 : 14 , 1964

ARMITAGE J. B. et al. - Chemistry of the vitamin B_{12}-group. Part III: The course of hydrolytic degradations. - J. Chem. Soc. 3849 , 1953

ARNOLD B. - The megaloblastic anaemias. - Med. J. Aust. 2 : 668 , 1962

ARNSTEIN H. R. V. - The function of vitamin B_{12} and folic acid in the metabolism of one-carbon-units. in "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor" 1. Europäisches Symposion Hamburg 1956 (Hrsg.: H.C.HEINRICH) S.86 ,Enke, Stuttgart 1957

BANDHAUER K., E. MARBERGER und H. MARBERGER - Immunologische Einflüsse auf männliche Fertilitätsstörungen. - Urologe 3 : 222 , 1964

BEAL R. W. - Studies on the plasma protein binding of radioactive vitamin B_{12}. I: Factors influencing in vitro binding. J. Lab. Clin. Med. 63 : 969 , 1964

BECK W. S. - The metabolic functions of vitamin B_{12}. - New Engl. J. Med. 266 : 708 u. 765 u. 814 , 1962

BEGEMANN H. und H. RASTETTER - Die Theorien der Perniciosa. Internist (Berlin) 3 : 115 , 1962

BERLIN H., R. BERLIN , G. BRANTE und S. G. SJØBERG - The absorption of IF-bound and free B_{12} in various clinical conditions. - in "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor" 2. Europäisches Symposion Hamburg 1961 (Hrsg.: H.C.HEINRICH) S.485,Enke,Stuttgart 1962

BERTCHER R. W., L. M. MEYER, H. VARMUS and C. MULZAC - Some characteristics of binding of vitamin B_{12} by normal human serum. - Acta Haemat. 23 : 287 , 1960

BOCK H. E., F. W. ALY, W. L. CASTRILLON-OBERNDORFER, M. EGGSTEIN, C. FRÖHLICH, J. HARTJE, G. W. LÖHR, D. MÜLLER, K. SEYNSCHE, D. VOSS, H. D. WALLER und W. WILMANNS - Verlaufsstudien an megaloblastären Anämien unter Vitamin B_{12}-Behandlung. - Klin. Wschr. 45 : 169 , 1967

BÖNNER G. - Die Dehydrierungsfähigkeit der menschlichen Spermatozoen in ihrer Beziehung zur Fertilität. - in: "Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten" JADASSOHN, Ergänzungswerk Bd. VI/3 S. 321 (Hrsg.: SCHUERMANN und DOEPFMER) Springer Berlin Göttingen Heidelberg 1960

BREHM G., H. GROPPER und G. W. KORTING - Vergleichende Untersuchungen über den Fructose- und Brenztraubensäuregehalt im menschlichen Sperma. - Arch. Klin. Exp. Derm. 202 : 180 , 1956

CASTRILLON-OBERNDORFER W. L. - Die Anwendung des Schillingtests bei einigen internen und neurologischen Krankheiten. - Med. Welt 1962 , 1443

CASTRILLON-OBERNDORFER W. L., H. STÜBER, J. FINKE, P. HOFFMANN, W. REISCHLE und P. OLDENKOTT - Urinexkretionstest mit radioaktivem Vitamin B_{12} (Schilling-Test) bei internen, neurologischen und psychiatrischen Krankheiten. - Dritte Jahrestagung der Gesellschaft für Nuklearmedizin in Lausanne 1965, Schattauer Stuttgart 1967

CHOSY J. J., A. KILLANDER and R. F. SCHILLING - Studies on hydroxocobalamin. -
in: "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor"
2. Europäisches Symposion Hamburg 1961
(Hrsg.: H.C.HEINRICH) S.668, Enke Stuttgart 1962

COMSTOCK R. E. - A study of the mammalian spermcell. -
J. Exper. Zool. 81 : 147 , 1939

COOPER B. A. and W. B. CASTLE - Sequential mechanisms in the enhanced absorption of vitamin B_{12} by intrinsic factor in rat. - J. Clin. Invest. 39 : 199 , 1960

DISHKOVICH L. - Über den Stoffwechsel von Vitamin B_{12} bei Affektionen von Leber- und Gallenwegen. -
Schweiz. Med. Wschr. 88 : 1087 , 1958

DOEPFMER R. - Zur Kenntnis der Aspermie. Die Bedeutung der Zahl der Spermien für die Zeugungsfähigkeit. -
Hautarzt 9 : 4 , 1958

DONALDSON R. M. and J. H. KATZ - Exchange between free and gastric juice-bound cyanocobalamin. -
J. Clin. Invest. 42 : 534 , 1963

DOSCHERHOLMEN A., P. R. FINLEY and P. S. HAGEN - Distribution of radioactivity in man after the oral ingestion of small test doses of radiolabeled cyanocobalamin. -
J. Lab. Clin. Med. 56 : 547 , 1960

EICHENBERGER E. und O. GOOSSENS - Fructose und Fructolyse im menschlichen Samen. -
Schweiz. Med. Wschr. 1950 , 1073

ELLENBOGEN L. and W. L. WILLIAMS - Preparations and properties of purified intrinsic factor. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 2 : 340 , 1960

FLEISCHHACKER H. - Anämien infolge Störungen der Erythropoese durch Vitamin B_{12} oder / und Folsäuremangel. - Wien. Z. Inn. Med. 42 : 345 , 1961

FLEISCHHACKER H. - Zur Therapie megaloblastärer Anämien. - Med. Klin. 58 : 720 , 1963

FRICK P. G. und H. E. BRUNNER - Megaloblastäre Folsäuremangelanämien bei Hämochromatosen. - Deutsch. Med. Wschr. 19 : 161 , 1964

GABBE E. E. - Neuere biochemische Untersuchungen zur Diagnostik und Therapie von B - Vitamin Mangelzuständen. Munchen. Med. Wschr. 19 : 995 , 1963

GELOTTE B., P. FLODIN and J. KILLANDER - Fractionation of human plasma proteins by gel filtration and zone electrophoresis or ion exchange chromatography. - Arch. Biochem. Suppl. - 1 : 319 , 1962

GOTTSCHALK A. - Physico-chemical methods for the determination of the purity, molecular size and shape of glycoproteins. in "Glycoproteins" (Hrsg.: A. GOTTSCHALK) B. B. A. Library, Vol. 5 : 29,Elsevier Amsterdam 1966

GRÄSBECK R. - Contributions to the biochemistry and physiology of vitamin B_{12} and intrinsic factor. - Finska Kemistsamf. Medd. 70 : 83 , 1961

HALL C. A., A. E. FINKLER - A second vitamin B_{12}-binding substance in human plasma. - Biochim. Biophys. Acta 78 : 233 , 1963

HALL C. A., A. E. FINKLER - The dynamics of transcobalamin. II: A vitamin B_{12}-binding substance in plasma. J. Lab. Clin. Med. 65 : 459 , 1965

HEATHCOTE J. G. and F. S. MOONEY - The oral treatment of pernicious anaemia. - Lancet 1958/1 , 982

HEINKE E. - Vitalitätsprüfung von menschlichen Spermien durch Eosinrotfärbung. - Z. Haut. Geschlechtskr. 10 : 254 , 1951

HEINRICH H. C. - Moderne Vitamin B_{12} Therapie: oral, rectal oder parenteral? Med. Welt 1963 , 762

HERRMANN W. P. - Die B_2-Fraktion im Spermaplasma. - Med. Klin. 33 : 1286 , 1966

HERRMANN W. P. und C. SCHIRREN - Immunelektrophoretische Untersuchungen des menschlichen Spermaplasmas. - Z. Haut. Geschlechtskr. 34 : 134 , 1963

HOLMES J. M. - Cerebral manifestation of vitamin B_{12} deficiency. - Brit. Med. J. 2 : 1394 , 1956

HOM B., H. OLESEN and P. LOUS - Fractionation of vitamin B_{12} binders in human serum. - J. Lab. Clin. Med. 68 : 958 , 1966

JOEL C. A. - Studien am menschlichen Sperma. Schwabe & Co, Basel 1953

JOEL C. A. und E. EICHENBERGER - Die Hyaluronidase, ein mucinspaltendes Ferment, und deren Bedeutung für das menschliche Sperma. - Schweiz. Med. Wschr. 75 : 601 , 1945

KALLEE E., S. DEBIASI, C. KARYPIDIS, K. HEIDE und H. G. SCHWICK - ^{60}Co Vitamin B_{12} bindende Glykoproteine. I. Mitteilung: Anreicherung und Charakterisierung ^{60}Co-Cyanocobalamin-bindender Glykoproteine aus Leukämikerharn und Normalharn. - Acta Isotopica (Padova) 4 : 103 , 1964

KALLEE E., W. L. CASTRILLON-OBERNDORFER, U. FEINE und J. FINKE - Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. IV. Mitteilung: ^{57}Co-Cyanocobalamin-Bindungskapazität des Harns bei einigen Blutkrankheiten und bei multiplen Sklerosen. - Klin. Wschr. 44 : 845 , 1966

KARYPIDIS C. - Über Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. - Dissertation, Tübingen 1966

KARYPIDIS C., E. KALLEE und K. ZEININGER - Vitamin B_{12}-bindende Glykoproteine. -
II. Mitteilung: Methode zur Bestimmung der Cyanocobalamin-Bindungskapazität des Urins. -
Klin. Wschr. 44 : 467 , 1966

KEETTEL W. C., R. G. BUNGE and J. T. BRADBURY - Report of pregnancies in infertile couples. -
J. Amer. Med. Ass. 160 : 102 , 1956

KELLER M. und R. TSCHUMI - Elektrophoretische Studien am menschlichen Spermaplasma. -
Gynaecologia (Basel) 135 : 92 , 1953

KIMMIG J. - Die Biochemie des menschlichen Spermas. -
Verh. Deutsch. Ges. Urol., Hamburg 1955, S. 87
Thieme Stuttgart 1957

KIMMIG J. und C. SCHIRREN - Klinische und biochemische Untersuchungen zum Nachweis von Inosit in Gegenwart von Fructose im menschlichen Sperma. -
Hautarzt 7 : 198 , 1956

LAWRENCE C. - The binding of vitamin B_{12} by serum proteins by normal and B_{12} deficient subjects. -
Brit. J. Haemat. 12 : 569 , 1966

LEITHOFF H. und W. LEITHOFF - Nachweis von Bluteiweißkörpern im menschlichen Seminalplasma mit Hilfe der Immunelektrophorese. - Med. Welt 1961 , 1137

LEITHOFF H. und W. LEITHOFF - Neue Ergebnisse immunelektrophoretischer Untersuchungen des menschlichen Samenplasmas. - Med. Welt 1962 , 181

LICHT W. und H. J. KEUTEL - Immunelektrophoretische Untersuchungen am menschlichen Spermaplasma mit homologen Antiseren. - Z. Urol. 56 : 401 , 1963

LINDSTRAND K. and K. G. STAHLBERG - On vitamin B_{12} forms in human plasma. - Acta Med. Scand. 174 : 665 , 1963

LUNDQUIST F. - Studies on the biochemistry of the human semen. Aminoacid and proteolytic encymes. - Acta Physiol. Scand. 25 : 178 , 1952

MAC LEOD - Semen quality in 1000 men of known fertility and in 800 cases of infertile marriage. - Fertil. Steril. 2 : 115 , 1951

MANN T. T. R. - Biochemistry of semen. - Methuen London 1954

MATTILA S. - Proteins of the human prostate tissue. - Ann. Chir. Gynaec. Fenn. 56 : 149 , 1967

MENDELSOHN R. S., D. M. WATKIN, A. P. HORBETT and J. L. FAHEY - Identification of the vitamin B_{12} binding protein in the serum of normals and of patients with chronic myelocytic leukemia. - Blood 13 : 740 , 1958

MENDELSOHN R. S. and D. M. WATKIN - Serum vitamin B_{12} concentrations, determined by lactobacillus leichmanii. Assay in patients with neoplastic disease. - J. Lab. Clin. Med. 51 : 860 , 1958

MICHELSON L. and D. KOETS - Relation between ascorbic acid and quality of human semen. - Fertil. Steril. 7 : 15 , 1956

MILLER A. and J. F. SULLIVAN - The "in vitro" binding of cobalt^{60} labeled vitamin B_{12} by normal and leukemic sera. - J. Clin. Invest. 37 : 556 , 1958

NIKOLOWSKI W. - Die Zeugungsfähigkeit des Mannes und ihre Störungen. in "Dermatologie und Venerologie" (Hrsg.: GOTTRON und SCHÖNFELD) Bd. I/2 S. 1272 Thieme Stuttgart 1962

NOCKE W. - Besteht eine Beziehung zwischen Spermaplasmaproteinen und männlicher Fertilität? Versuch einer Charakterisierung der Proteinfraktionen von Spermaplasma aus normalen und pathologischen Ejakulaten. - Dissertation Bonn 1959

NOWAKOVSKI H. und H. SCHMIDT - Die Hodenveränderungen beim alternden Mann und deren klinische Bedeutung. - Schweiz. Med. Wschr. 89 : 1204 , 1959

OBE G. und G. HERRMANN - Papierelektrophoretische Untersuchungen an Spermaplasma, Ejakulat und Prostatasekret. - Z. Urol. 47 : 393 , 1954

PANZRAM G. - Die Glukoseverwertung bei perniciöser Anämie unter dem Einfluß der Vitamin B_{12} Therapie. - Schweiz. Med. Wschr. 91 : 234 , 1961

PITNEY W. R., M. F. BEARD and E. Y. VAN LOON - Observations on the bound form of vitamin B_{12} in human serum. - J. Biol. Chem. 143 : 207 , 1954

PRIBILLA W. - Der Vitamin B_{12} Stoffwechsel und seine Störungen. - Blut 8 : 487 , 1962

RABACH J. und J. HRADEC - Die quantitative Fructosebestimmung im menschlichen Ejakulat. - Endokrinologie 31 : 171 , 1954

REISNER D. J. and R. M. ELLSWORTH - Coexistent idiopathic hypoparathyroidism and pernicious anaemia in a young girl. - Ann Intern. Med. 43 : 1116 , 1955

RICKES E. L., N. G. BRINK, F. R. KONIUSZY, T. R. WOOD and K. FOLKERS - Crystalline vitamin B_{12}. - Science 107 : 396 , 1948

ROSENTHAL H. L., R. P. MYERS and G. O'BRIEN - The determination of serum vitamin B_{12} binding capacity. - in "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor" 2. Europäisches Symposion Hamburg 1961 (Hrsg.: H. C. HEINRICH) S. 410 , Enke Stuttgart 1962

SCHMID J. R., S. MOESCHLIN and V. HAEGI - Pernicious anaemia: An erythrokinetic and autoradiographic study, using H^3-thymidine, H^3-uridine and H^3-cytidine. Acta Haemat. 32 : 65 , 1964

SCHNEIDER W., H. NOWAKOVSKI und D. VOIGT - Die Papierelektrophorese von menschlichem Spermaplasma. I. Mitteilung: Methode und Art der Fraktionen. - Klin. Wschr. 32 : 863 , 1954

SCHMIDT M. - Fractionation of acid mucopolysaccharides on DEAE-Sephadex ion exchanger. - Biochim. Biophys. Acta 63 : 346 , 1962

SCHULTZE H. E. - Über Glykoproteine. - Deutsch. Med. Wschr. 1958, 1742

SEARCY R. J. and R. G. CRAIG - Immunochemical nature of protein constituents of human seminal plasma. - Clin. Res. 9 : 241 , 1961

SILLO-SEIDEL G. - Die Bewegungslehre der menschlichen Samenfäden. - Karger Basel und New York 1963

SIMONS K. - Vitamin B_{12} binders in human body fluids and blood cells. - Societas Scientiarum Fennica, Commentationes Biologicae XXVII 5, Minerva Found. Inst., Helsinki 1964

SMITH E. L. - Biological aspects of vitamin B_{12} chemistry. in "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor" 1. Europäisches Symposion Hamburg 1956 (Hrsg.: H. C. HEINRICH) S. 1 , Enke Stuttgart 1957

STIGLER R. - Wärmelähmung und Wärmestarre menschlicher Spermatozoen. - in "Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten" JADASSOHN , Ergänzungswerk Bd. VI/3 S. 319 (Hrsg.: SCHUERMANN und DOEPFMER) Springer Berlin Göttingen Heidelberg

STÜBER H. - Die perniciöse Anämie. - Dissertation Tübingen 1966

SUREAU B., J. BERROD, L. MARTIN et L. FOISIL - L'hydroxocobalamine. Vitamine B_{12} retard naturelle. - Presse Med. 70 : 1388 , 1962

SZIVOS A. und I. KERESZTES - Die Behandlung der poliomyelitischen Lähmungen mit Vitamin B_{12}. - Ther. Hung. 4 : 19 , 1955

TSCHUMI R. - Zur Physiologie der Spermienbewegung und deren Beeinflussung durch Vitamine und Hormone. - Gynaecologia (Basel) 135 : 87 , 1953

VASTERLING H. W. - Praktische Spermatologie. - Thieme Stuttgart 1960

VRUBLOVSKY P., B. A. LANG, E. LINDNER and F. SANTAVY - Studies on the glykoproteins of human seminal plasma. Physiol. Bohemoslov. 15 : 179 , 1966

WACKER A. - Beziehungen zwischen B_{12}, Coenzym F und dem Nukleosidstoffwechsel. - in "Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor" 1. Europäisches Symposion Hamburg 1956 (Hrsg.: H.C.HEINRICH) S.109 , Enke Stuttgart 1957

WEINSTEIN I. B., S. M. WEISMANN and D. M. WATKIN - The plasma vitamin B_{12} binding substance. I: Its detection in the seromucoid fraction of plasma from normal subjects and patients with chronic myelocytic leukemia. - J. Clin. Invest. 38 : 1904 , 1958

WEIMER H. E., J. W. MEHL and R. J. WINZLER - Studies on the mucoproteins of human plasma. V: Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. - J. Biol. Chem. 185 : 561 , 1950

Lebenslauf

Am 4. Mai 1942 wurde ich, Michael Kroehling, als zweiter Sohn des Rechtsanwaltes Dr. Hans Kroehling und seiner Ehefrau Christa Kroehling, geb. Mutschler, in Posen geboren.

Von 1948 bis 1950 besuchte ich die Volksschule Etterzhausen Kreis Regensburg, von 1950 bis 1952 die Vorschule der Regensburger Domspatzen in Etterzhausen, von 1952 bis 1953 das Neue Gymnasium in Regensburg und von 1953 bis 1962 die Oberrealschule Regensburg, wo ich im Juli 1962 die Reifeprüfung ablegte.

1962 begann ich an der Universität zu Tübingen mit dem Studium der Medizin. 1963 legte ich in Tübingen die naturwissenschaftliche und 1965 die ärztliche Vorprüfung ab. In den klinischen Semestern studierte ich an den Universitäten München, Kiel und Tübingen. Am 17. 2. 1969 bestand ich die ärztliche Prüfung in Tübingen.